



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO em CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, especialidade em Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional

**CARNE DE CONSUMO E RISCO DE
TRANSMISSÃO DE *Toxoplasma gondii***

Joana de Carvalho Serra Rosado

Lisboa, Janeiro 2009



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



CARNE DE CONSUMO E RISCO DE TRANSMISSÃO DE *Toxoplasma gondii*

Joana de Carvalho Serra Rosado

*Tese apresentada para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Biomédicas, especialidade de Biologia
Molecular em Medicina Tropical e
Internacional.*

Dissertação orientada pela Professora Doutora Olga Matos

Mestrado coordenado pela Professora Doutora M.^a Amélia Grácio

Janeiro, 2009

PRÓLOGO

Este trabalho foi realizado na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa. No decorrer deste trabalho foi apresentado um poster e publicado um *abstract* com o título “Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Pigs from Portugal” no X *Internacional Workshops on Opportunistic Protists* (IWOP-10) em Maio de 2008 em Boston, USA. Foi também apresentado um poster no Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, Sida e Parasitologia, com o título: “Carne de porco para consumo e risco de transmissão de *Toxoplasma gondii*”, em 9 e 10 de Outubro de 2008, em Vilamoura, Portugal.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Olga Matos, minha orientadora na elaboração deste trabalho, por me ter prestado todo o seu apoio, incentivo e disponibilidade. Agradeço-lhe ainda o seu companheirismo e amizade.

À Dr.^a M.^a Luísa Lobo e ao Dr. Francisco Esteves, pela disponibilidade, auxílio e paciência que, com a sua experiência e amizade muito contribuíram, para a realização do trabalho.

Ao Dr. António Amorim, pela gentileza com que me recebeu no Laboratório.

Aos inspectores sanitários do Matadouro Regional do Alto Alentejo, de Sousel, Dr. José Maria Perdigão, Dr. António Peças, Eng. Agostinho Pinto, Dr. Nuno Fernandes, Dr. José Inácio Valias e a todos os outros trabalhadores do Matadouro, o meu muito obrigado, pela amabilidade e auxílio na recolha das amostras.

A todos os meus colegas do I Mestrado de Ciências Biomédicas, por estes dois anos memoráveis de convívio e amizade.

À Daniela de Aguiar e ao Nuno Martins, “companheiros de estrada”, pela partilha de experiências, apoio e amizade.

Ao Instituto Português de Oncologia de Lisboa, por ter tornado possível a compatibilidade entre a minha actividade profissional e a realização deste Mestrado.

Ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), pela cedência de amostras positivas para a realização das técnicas de Biologia Molecular.

À BioMérieux, pelo apoio logístico cedido durante a execução deste trabalho.

À minha mãe, pela revisão do texto e apoio incondicional.

RESUMO

O consumo de carne de suíno (*Sus domesticus*) é considerado o maior factor de risco para a transmissão da toxoplasmose aos humanos. No entanto, apesar dos suínos serem muito usados na gastronomia portuguesa, tanto pelo consumo de carne, como pelo de enchidos, pouco se sabe sobre a prevalência e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* nestes produtos alimentares, no país. Neste trabalho, pretendeu-se determinar a seroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em suínos de consumo e detectar e diferenciar as estirpes de *T. gondii* isoladas em tecidos e em derivados de carne de suínos. Pela pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, a partir do teste de aglutinação directa modificada, com limiar de detecção de 4 IU/mL, detectou-se anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 27 (7,1%) dos 381 suínos estudados. Dez (7,9%) dos 127 suínos da raça Large White e 17 (6,7%) dos 254 suínos estudados da raça Alentejana apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Verificou-se que os suínos, serologicamente positivos, eram provenientes das quatro (100%) explorações com práticas de produção intensiva, e de quatro (33,3%) das 12 explorações com produção extensiva, utilizadas na recolha das amostras, provenientes do Alto Alentejo. A pesquisa de *T. gondii*, efectuada através da amplificação do gene B1, por *nested*-PCR, permitiu detectar o parasita em sete suínos (sete encéfalos e dois diafragmas) e em dois produtos de carne de suínos transformados. Posteriormente, procedeu-se à caracterização genética das estirpes encontradas, a partir da amplificação do *locus* do gene SAG2, seguida de sequenciação. No entanto, não foi possível identificar as estirpes presentes nestas amostras. As técnicas utilizadas, neste trabalho, para a caracterização genética das estirpes do parasita isoladas, demonstraram pouca sensibilidade. Contudo, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* obtida, em suínos destinados ao consumo humano, e o facto de ter sido possível detectar *T. gondii* em amostras de tecido dos

suínos e em produtos alimentares, vulgarmente consumidos pelo Homem, demonstram que estes produtos podem representar, ainda, um risco para a Saúde Pública de transmissão da toxoplasmose, no nosso país.

PALAVRAS-CHAVE

Toxoplasma gondii; suínos; carne; enchidos; estirpes.

ABSTRACT

Pigs (*Sus domesticus*) meat consumption has been considered the major source of transmission of toxoplasmosis to humans. Pork is widely used in the Portuguese gastronomy, although little is known about the prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat and derivatives used for human consumption in Portugal. The aim of the present study was to survey the prevalence of anti-*T. gondii* IgG antibodies in pigs used for human consumption and to detect and genotype *T. gondii* strains isolated from tissue and from derivatives meat products from pigs. Antibodies to *T. gondii* were found in serum samples from 27 (7,1%) of the 381 pigs studied, using the modified direct agglutination test at threshold detection of 4 IU/mL. Ten (7,9%) of the 127 pigs from the Large White breed and 17 (6,7%) of the 254 pigs from Porco Alentejano breed presented anti-*T. gondii* IgG antibodies in serum. Seropositive samples were from the four (100,0%) explorations with intensive management practices and from four (33,3%) of the 12 explorations with extensive management practices from Alto Alentejo, where biological samples were collected. Through amplification of B1 gene by *nested*-PCR *T. gondii* was detected in seven pigs (seven brains and two diaphragms) and in two derivative pig's meat. Then genetic

characterization of *T. gondii* strains isolates was made by amplification of the *locus* SAG2 gene, followed by sequencing. However it was not possible to identify these strains. In this work the techniques used for genetic characterization of parasite strains presented low sensitivity. Nevertheless the prevalence of IgG antibodies anti-*T. gondii* and the detection of the parasite in the tissue samples and meat products consumed by humans suggest that pigs for human consumption still can represent a public health risk of *T. gondii* transmission in our country.

KEYS WORD

Toxoplasma gondii; pigs; meat; sausage; strain.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE QUADROS	xii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiv
I - Introdução	1
História	3
Taxonomia.....	6
Morfologia e Ciclo de Vida.....	7
Genoma.....	13
Epidemiologia.....	14
Transmissão	15
Importância da carne na transmissão de <i>T. gondii</i>	16
Características de resistência e sobrevivência dos quistos	18
Patologia	20
Virulência e diferenças nas estirpes.....	23
Diagnóstico	26
Tratamento	31
II - Objectivos	33
III – Material e Métodos	34
3.1. Estudo serológico em suínos domésticos	34
3.1.1. Amostra.....	34
3.1.2. Toxo-Screen DA	36
3.2. Detecção genética de <i>T. gondii</i>	38
3.2.1. Amostra.....	38
3.2.2. Extracção de DNA de <i>T. gondii</i>	40
3.2.3. <i>Nested-PCR</i> do gene B1 de <i>T. gondii</i>	42
3.2.4. Detecção dos produtos de DNA amplificados por <i>nested-PCR</i>	45
3.3. Caracterização genética das estirpes de <i>T. gondii</i>	45
3.3.1. Amostra.....	46
3.3.2. <i>Nested-PCR</i> do gene SAG2 de <i>T. gondii</i>	46
3.3.3. Purificação dos produtos de <i>nested-PCR</i>	49
3.3.4. Sequenciação dos produtos de <i>nested-PCR</i>	51
IV - Resultados.....	52

4.1. Estudo serológico em suínos domésticos: detecção e semi-quantificação de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>	52
4.2. Detecção genética de <i>T. gondii</i> : amplificação do gene B1.....	56
4.3. Caracterização genética das estirpes de <i>T. gondii</i> : amplificação do gene SAG2	61
V - Discussão dos resultados	63
VI - Conclusão	74
Referências bibliográficas	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	8
Figura 2. A. Estrutura do taquizoíto; B. Estrutura do bradizoíto; C. Estrutura do esporozoíto (adapado de Dubey <i>et al.</i> 1998 ³²).....	9
Figura 3. A. Taquizoítos de <i>T. gondii</i> ; B. Quisto tecidular de <i>T. gondii</i> ; C. Oocistos de <i>T. gondii</i> não esporulados; D. Oocisto de <i>T. gondii</i> esporulado. (Fonte: http://www.dpd.cdc.gov/ acedido pela última vez a 20 de Dezembro de 2008).....	13
Figura 4. Principais vias de transmissão de <i>T. gondii</i> aos hospedeiros definitivos e intermediários.....	16
Figura 5. Evolução da toxoplasmose nos hospedeiros intermediários (humanos).....	20
Figura 6. Cinética dos anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (Adaptado de Antunes, F., 1984 ⁶).....	28
Figura 7. Resultados da detecção da amplificação do gene B1, por electroforese em gel de agarose (1,5%). 1, 10-11, 18. Amplificação do gene B1; 2-9, 12-17. Ausência de amplificação do gene B1; 17. Controlo Negativo; 18. Controlo Positivo; 19. Marcador de Peso Molecular (100 pb).....	57

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição das amostras dos suínos da raça Large White por sexo e idade.	34
Quadro 2. Distribuição das amostras dos suínos da raça Alentejana por sexo e idade.	35
Quadro 3. Correspondência entre a diluição e o título em anticorpos (IU/mL).....	37
Quadro 4. Distribuição das amostras recolhidas de tecidos muscular e nervoso de suínos.	38
Quadro 5. Distribuição das amostras de tecido muscular e nervoso de suínos com resultados negativos de serologia, submetidos à amplificação por PCR para detecção de DNA de <i>T. gondii</i>	39
Quadro 6. Distribuição das amostras recolhidas de enchidos de suínos.	39
Quadro 7. Sequências iniciadoras utilizadas nas reacções da <i>nested</i> -PCR para amplificação do gene B1 de <i>T. gondii</i>	42
Quadro 8. Composição da mistura reaccional da <i>nested</i> -PCR para amplificação do gene B1 <i>T. gondii</i>	44
Quadro 9. Sequências iniciadoras utilizadas nas duas reacções de <i>nested</i> -PCR para amplificação do gene SAG2 <i>T. gondii</i>	46
Quadro 10. Composição da mistura reaccional da <i>nested</i> -PCR para amplificação do gene SAG2 <i>T. gondii</i>	47
Quadro 11. Distribuição dos resultados de serologia dos suínos da raça Large White pelas quatro explorações provenientes da região do Alto Alentejo.....	52
Quadro 12. Distribuição dos resultados positivos de serologia dos suínos da raça Large White por sexo.....	53
Quadro 13. Distribuição dos resultados positivos de serologia dos suínos da raça Large White por grupo etário.....	53
Quadro 14. Distribuição dos resultados de serologia dos suínos da raça Alentejana pelas explorações provenientes da região do Alto Alentejo.....	54
Quadro 15. Distribuição dos resultados positivos de serologia dos suínos da raça Alentejana por sexo.	54
Quadro 16. Distribuição da seroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> , em suínos provenientes da região do Alto Alentejo.	55
Quadro 17. Distribuição da seroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> , em suínos provenientes da região do Alto Alentejo, por sexo.	55

Quadro 18. Distribuição da seroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> , em suínos provenientes da região do Alto Alentejo, por grupo etário.	55
Quadro 19. Distribuição dos títulos de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> nos suínos com resultados positivos de serologia.	56
Quadro 20. Distribuição dos resultados positivos da detecção de DNA de <i>T. gondii</i> , após amplificação por <i>nested</i> -PCR do gene B1, em suínos serologicamente positivos.	58
Quadro 21. Distribuição do título de anticorpos, IgG anti- <i>T. gondii</i> , nos suínos em que se detectou DNA de <i>T. gondii</i> , por <i>nested</i> -PCR do gene B1.....	59
Quadro 22. Comparação dos títulos de anticorpos, IgG anti- <i>T. gondii</i> , com a presença de DNA de <i>T. gondii</i> nos tecidos muscular e nervoso.	59
Quadro 23. Distribuição dos resultados positivos da detecção de DNA de <i>T. gondii</i> , após amplificação por <i>nested</i> -PCR do gene B1, em suínos serologicamente negativos.	60
Quadro 24. Distribuição dos resultados da detecção de DNA de <i>T. gondii</i> , nos produtos transformados de carne de suínos, após amplificação por <i>nested</i> -PCR do gene B1.	60
Quadro 25. Distribuição dos resultados da amplificação por <i>nested</i> -PCR das extremidades 5' e 3' do gene SAG2 de <i>T. gondii</i>	62

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2-ME – 2-Mercaptoetanol

°C – Graus Célsius

\leq - Igual ou inferior

\geq - Igual ou superior

BSA – *Bovine serum albumine*

CH₃COONa – Acetato de sódio

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxiribonucleic acid*

dNTP – 2'-desoxinucleotídeo-5' –trifosfato

E.U.A. – Estados Unidos da América

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetracético

et al. – E outros

g – Campo gravitacional (em centrifugação)

g – Grama

h – Hora

HCL – Cloreto de hidrogénio

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IU/mL – Unidade internacional por mililitro

Kb – Kilobases

LD₁₀₀ – Dose letal absoluta

M – Molar

m/v – Massa/volume

MAT – *Modified Agglutination Test*

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – Minutos

μL – Microlitro

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mol/L – Mol por litro

NaCl – Cloreto de sódio

NH_4 – Amónio

p.i. - Após a infecção

PAS – Ácido Periódico de Schiff

pb - Par de base

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH – $(-\log[\text{H}^+])$

pmol - Picomol

RFLP – *Restriction Fragments Length Polymorphism*

SAG - Gene do antígeno de superfície

seg - Segundos

Sida - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC - Sistema Nervoso Central

T. gondii – *Toxoplasma gondii*

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

v/v – Volume/volume

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

x – Vez

I - INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose muito comum, de disseminação mundial, causada por um parasita intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*. Estima-se que cerca de um terço da população mundial já tenha sido exposta a este parasita ubiquitário^{43,75}. Apesar deste ter sido descoberto há cerca de cem anos, em 1908, o seu complexo ciclo de vida, heteroxeno facultativo, só foi completado em 1970, quando a fase sexual foi identificada nos hospedeiros definitivos, membros da família *felidae*⁴⁸. *T. gondii* é reconhecido como um dos parasitas mais polixenos, ao infectar vários tipos de células, de provavelmente todos os animais de sangue quente, incluindo o homem⁷⁵.

Em Portugal, a prevalência desta parasitose na população humana varia entre 35% no Sul a 70% no Norte do País, ocorrendo 11 casos de toxoplasmose congénita em cada 10000 nascimentos, existindo cerca de 124 casos de toxoplasmose congénita por ano⁵.

A toxoplasmose é uma doença oportunista, geralmente assintomática nos indivíduos imunocompetentes, no entanto, complicações graves como retinocoroidite, hidrocefalia, calcificações intracranianas e distúrbios psicomotores poderão surgir nos casos congénitos. Nos doentes imunocomprometidos, como os transplantados, oncológicos e os infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), esta doença surge como uma causa importante de morbilidade e mortalidade. Estima-se que a toxoplasmose seja responsável por cerca de 10-30% das mortes dos pacientes com sida nos E.U.A. e na Europa⁴³. Apesar de existir terapêutica, os medicamentos disponíveis no mercado apenas promovem a morte das formas de multiplicação activa do parasita (taquizoítos), não actuando sobre os quistos que se formam nos músculos, tecido cerebral e retina, durante a evolução da doença para a cronicidade⁴³.

A transmissão ao homem é vulgarmente associada à ingestão de oocistos, nos alimentos ou água contaminados, provenientes das fezes dos felinos, contudo, a ingestão de carne crua ou mal cozida, contaminada com quistos, é uma das principais vias de transmissão do parasita ao Homem³⁹. Estudos serológicos e moleculares evidenciaram a disseminação da toxoplasmose nos animais utilizados na alimentação. Dos animais utilizados no consumo alimentar, os suínos (*Sus domesticus*) são considerados uma das fontes mais importantes na transmissão da infecção ao Homem.

A possibilidade do genótipo do parasita influenciar a severidade da doença nos humanos é suportada pelos diferentes graus de virulência observados nos modelos experimentais¹⁷. Desta forma, a estirpe poderá estar associada ao aparecimento das formas mais ou menos graves da doença.

História

1908 - Descoberta de *T. gondii*, simultaneamente em dois locais distintos do globo. No laboratório do Instituto Pasteur de Tunis (Tunísia), quando Nicolle e Manceaux, ao estudarem a epidemiologia da leishmaniose num pequeno roedor (*Ctenodactylus gundi*) do norte de África, capturado no sul da Tunísia (Matmata), verificaram que um número elevado de animais morria, alguns dias após a sua captura. Do fígado e do baço, foi isolado, destes animais, um protozoário que denominaram *Leishmania gondii* e, no ano seguinte, *Toxoplasma gondii*. Esta observação foi concomitante à de Splendore, no Brasil, ao ter encontrado o mesmo parasita em vísceras de coelho⁶.

1910 - Primeira descrição de toxoplasmose num canídeo, por Mello, em Turin, na Itália⁶⁰.

1913 - Primeiro caso de toxoplasmose humana, descrito em 1913, por Castellani⁶⁰.

1923 – Janku, oftalmologista em Praga, descreveu o primeiro caso de toxoplasmose congénita, numa criança de 11 meses de idade, que apresentava hidrocefalia e microftalmia^{60,75}.

1928 - Levaditi, Schoen e Sanchis, pelo estudo da infecção toxoplásmica experimental, em coelhos e ratos, descreveram a forma quística do parasita⁶⁰.

1937 - Descrição do primeiro caso fatal de toxoplasmose humana disseminada, num adulto de 22 anos de idade⁷⁵. Nesse mesmo ano, Wolf e Cowen atribuíram a *Encephalitozoon chagasi* o caso fatal duma criança com encefalite granulomatosa, tendo sido feito, mais tarde, o diagnóstico correcto através das descrições de Sabin e Olitski sobre a toxoplasmose em cobaias⁶.

1939 - Descrita a tríade clássica de sintomas na toxoplasmose congénita humana (retinocoroidite, hidrocefalia e encefalite seguida de calcificação cerebral)⁷⁵.

Entre 1940-1941 – *T. gondii* foi reconhecido como agente causal de doença aguda, adquirida em humanos adultos⁷⁵.

1948 - Sabin e Feldman aplicaram ao diagnóstico da toxoplasmose uma técnica imunológica, *Dye Test*. Primeiro teste de detecção de anticorpos específicos anti-*T. gondii* (Antunes, 1984)⁷⁵.

1952 - A partir dos meados dos anos 50, foram feitos vários estudos sobre a transmissão do parasita. Descrita a téttrade de sintomas na toxoplasmose congénita humana (retinocoroidite, encefalite seguida de calcificação cerebral, hidrocefalia ou microcefalia e distúrbios psicomotores)⁷⁵.

1954 - Weinman e Chandler sugeriram que a transmissão do parasita pudesse ocorrer através da ingestão de carne de porco mal cozida^{48,75}.

1960 - Jacobs *et al.* demonstraram que os toxoplasmas, existentes nos quistos, eram resistentes às enzimas proteolíticas, tendo sugerido que a transmissão parasitária pudesse ocorrer por via alimentar⁶.

1965 – Foi comprovada a hipótese da transmissão de *T. gondii*, através da ingestão de carnes infectadas, por Desmonts *et al.* a partir de um estudo feito em crianças tuberculosas, internadas no Hospital Léon Bernard, em Paris. Estas crianças foram alimentadas duas vezes por semana com carne mal cozida, quase crua. Ao fim de 6-12 meses, 80% das crianças, desprovidas de anticorpos na altura da admissão no hospital, adquiriram a infecção. A taxa de infecção, de 10% antes da admissão no hospital, subiu para 50% naquelas crianças que comiam carne de vaca ou de cavalo quase crua e para 100% nas que ingeriam carne de carneiro quase crua⁶. Nesse mesmo ano, Hutchison relatou pela primeira vez a presença de toxoplasmas em fezes de gato,

admitindo que estes parasitas tivessem sido veiculados nos ovos do nemátodo, *Toxocara cati*. A teoria da transmissão da toxoplasmose, através dos ovos de nemátodos foi abandonada, quando foram encontrados toxoplasmas em fezes de gatos sem ovos de nemátodos^{6,75}.

1968 – Reconhecimento do agravamento do estado clínico de doentes, após infecção por *T. gondii*⁷⁵.

1969 - Descrição de um surto epidémico de toxoplasmose em estudantes de medicina da Universidade de Cornell que tinham ingerido *hamburgers* mal passados, por Kean *et al.*,⁶. Identificação do oocisto de *T. gondii*⁷⁵.

Entre 1969-72 - Reconheceu-se o papel epidemiológico dos gatos na transmissão de *T. gondii*, em diferentes áreas geográficas do mundo⁷⁵.

1970 – Estabeleceu-se o ciclo de vida de *T. gondii*, ao ser descoberta a fase sexuada da multiplicação do parasita, no intestino delgado do gato. Os oocistos deste protozoário foram caracterizados, morfológica e biologicamente, por Dubey, Millar e Frenkel^{6, 48}.

1980 - No início da década de 80, foram reportados os primeiros casos de toxoplasmose no Sistema Nervoso Central (SNC) em doentes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (sida).

1984 - Atribuição do conceito “parasita oportunista” a *T. gondii*⁷⁵.

Entre 1995-99 - Demonstrou-se a transmissão de *T. gondii* aos humanos, associada à ingestão de água de consumo infectada com oocistos⁷⁵.

Taxonomia

Nos últimos anos, tem sido discutida a classificação taxonómica dos protozoários, com especial atenção no grupo dos coccídeos, onde existe elevada controvérsia, por ser um dos maiores grupos de protozoários e por compreender muitas espécies com importância médica e veterinária⁷⁴.

T. gondii é um protozoário que foi classificado como Coccídia, pertencente ao filo *Apicomplexa*, onde estão incluídas cerca de 5000 espécies, por conterem complexo apical, conjunto de organelos importantes na invasão celular, situados na zona apical da célula. Pertence à ordem *Eimeriida*, sub-ordem *Eimeriorina*, família *Sarcocystidae*, sub-família *Toxoplasmatinae*, género *Toxoplasma*, segundo Levine em 1988⁷⁴. No entanto, através dos conhecimentos adquiridos sobre a biologia e caracterização genética do parasita, a sua taxonomia e filogenia têm sido amplamente investigadas, propondo-se vários esquemas classificativos.

A classificação taxonómica, mais recentemente adoptada para este parasita, é a seguinte:

Reino: *Protozoa* (Goldfuss, 1918)

Sub-Reino: *Biciliata*

Infra-Reino: *Alveolata* (Cavalier-Smith, 1991)

Filo: *Myxozoa* (Cavalier-Smith & Chao, 2004)

Sub-Filo: *Apicomplexa*

Classe: *Conoidasida* (Levine, 1988)

Sub-Classe: *Coccidiasina* (Leuckart, 1879)

Ordem: *Eucoccidiorida* (Léger & Duboscq, 1910)

Sub-Ordem: *Eimeriorina* (Léger, 1911)

Família: *Sarcocystidae* (Poche, 1913)

Sub-Família: *Toxoplasmatinae* (Biocca, 1957)

Gênero: *Toxoplasma* (Nicolle & Manceaux, 1909)

Espécie: *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909)

Fonte: Taxonomicon - <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1310> última vez acedido a 20 de Dezembro de 2008.

Morfologia e Ciclo de Vida

A designação de *T. gondii* advém do grego *taxon* (arco) e *plasma* (forma), sendo justificada pela sua morfologia em forma de arco ou meia lua. É um parasita intracelular obrigatório, que invade e se desenvolve em diferentes células nucleadas, com maior afinidade para as do sistema fagocítico mononuclear, leucócitos e células parenquimatosas.

Existem três estádios infecciosos em *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos (contidos no interior dos quistos) e os esporozoítos (contidos no interior dos oocistos esporulados), que estão ligados a um complexo ciclo de vida heteroxeno facultativo. A fase sexual é altamente específica, ocorrendo apenas nos membros da família *felidae* (hospedeiros definitivos) em contraste com a fase assexual pouco específica, por ocorrer em praticamente todos os animais homeotérmicos, mamíferos e aves (hospedeiros intermediários) (Figura 1).

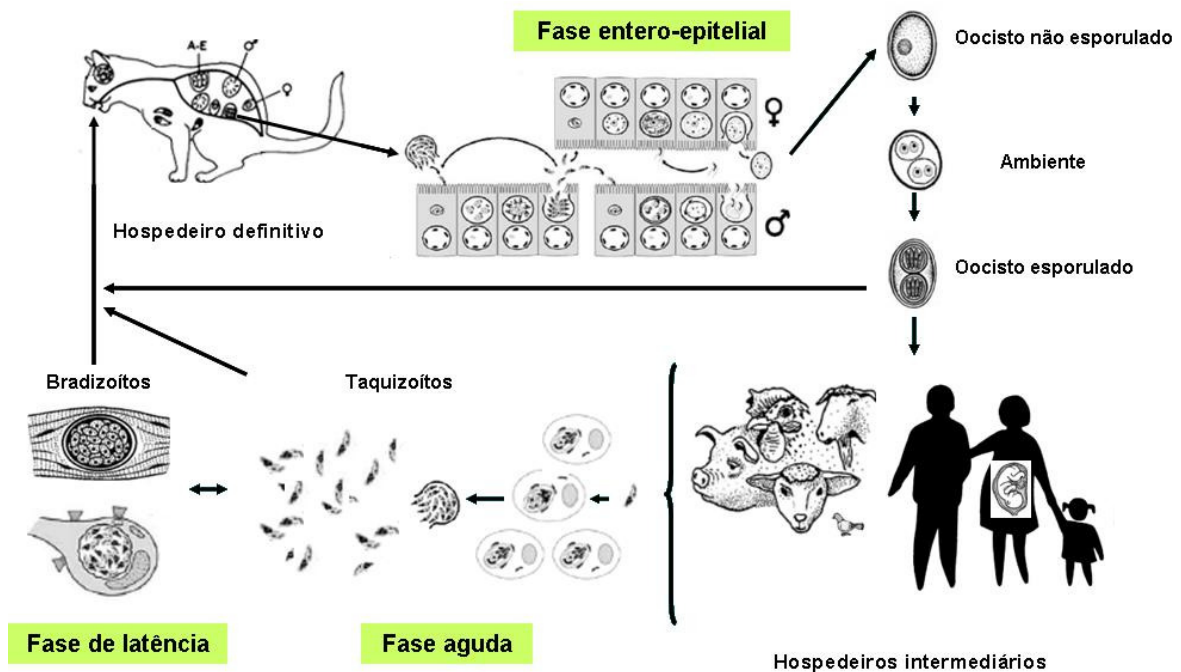


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii*.

Os taquizoítos, (do grego *tachys* = rápido), designação dada por Frenkel, em 1973, para descrever o estágio de multiplicação rápida em qualquer célula do hospedeiro intermediário e nas células epiteliais não intestinais dos hospedeiros definitivos, têm muitas vezes uma morfologia semilunar («em crescente») com cerca de 2 a 4 micrómetros (μm) de largura e 4 a 8 μm de comprimento (Figura 2 e 3). A sua extremidade anterior é afilada e a posterior é arredondada. Estruturalmente, o taquizoíto é delimitado por uma película trimembranar característica, constituída pela membrana plasmática, que é forrada pelo complexo membranar interno. Na extremidade anterior do taquizoíto localiza-se o complexo apical, constituído por um conjunto de organitos característicos: anéis apicais, anéis polares, conóide, roptrias, micronemas e grânulos densos, que desempenha um importante papel na invasão celular. Outros organitos como microsporo, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, ribossomas, grânulos de glicogénio, apicoplasto e um núcleo bem definido

podem ser encontrados. Este último está quase sempre situado próximo da extremidade posterior ou no centro da célula (Figura 2). O nucléolo situa-se no centro do núcleo, enquanto que a cromatina está disposta irregularmente, junto à membrana nuclear sob a forma de rede ou de granulações³².

Após a entrada dos taquizoítos na célula, esta torna-se ovóide, ficando os taquizoítos isolados pelo vacúolo parasitóforo. Pensa-se que esta estrutura se forme a partir do parasita e da célula hospedeira³²; porém, o taquizoíto, ocasionalmente, pode invadir o núcleo da célula parasitada. O taquizoíto multiplica-se assexuadamente, por múltiplas endodiogenias no interior da célula parasitada. A endodiogenia é uma forma particular de divisão assexuada, na qual as células-filhas se formam no interior da célula-mãe, acabando esta por se destruir no final da formação das células-filhas. Poderá ocorrer o rebentamento das células do hospedeiro, uma vez que, os taquizoítos prosseguem a sua multiplicação até preencherem a célula do hospedeiro³².

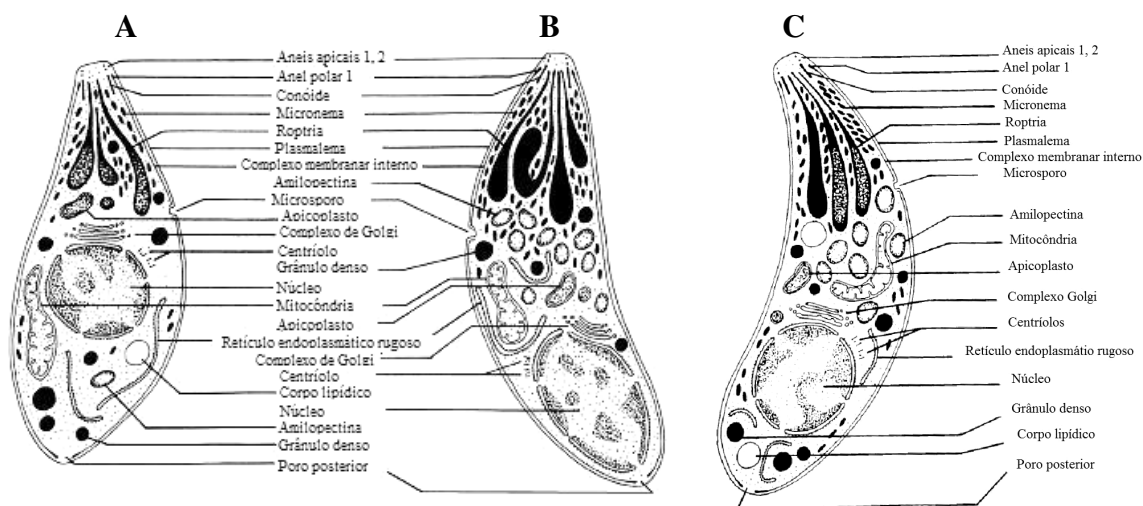


Figura 2. A. Estrutura do taquizoíto; B. Estrutura do bradizoíto; C. Estrutura do esporozoíto (adaptado de Dubey *et al.* 1998³²).

Após alguns ciclos de multiplicação, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos (do grego brady = lento), também referidos por Frenkel, em 1973, para a descrição das formas parasitárias com multiplicação lenta que se encontram dentro de quistos³². O desenvolvimento dos quistos define a fase crónica do ciclo assexuado do parasita no hospedeiro^{10,26,32}. Apesar de serem produzidos no início da infecção, podendo ser encontrados três dias após a infecção (p.i.), geralmente só são numerosos sete semanas p.i.^{32, 48}.

Os bradizoítos são usualmente esféricos ou então adoptam a forma das células que parasitam. A parede quística é elástica e fina, permitindo que estes cresçam no interior das células à medida que os parasitas se dividem por endodiogenia. Desta forma, os quistos variam de tamanho, sendo os mais jovens de pequenas dimensões (5 µm de diâmetro), com apenas dois bradizoítos no seu interior, enquanto que os mais velhos podem atingir 100 µm de comprimento e conter centenas de bradizoítos (Figura 2 e 3)³². A localização e o número de quistos diferem com os hospedeiros e com a estirpe de *T. gondii*^{26,32}. Pouco se sabe sobre os factores de especificidade do parasita para as células do hospedeiro, no entanto, apesar de poderem desenvolver-se em vários órgãos, tais como: pulmões, fígado e rins, estes são mais prevalentes em tecidos nervosos e musculares incluindo o cérebro, olhos e músculo esquelético e cardíaco³². Os bradizoítos diferem morfológicamente dos taquizoítos, porque naqueles o núcleo está situado mais próximo da extremidade posterior, enquanto que nos taquizoítos ele é mais central. Além disso, os bradizoítos contêm abundantes grânulos de glicogénio que coram de vermelho com o Ácido Periódico de Schiff (PAS), material que existe em quantidades mínimas nos taquizoítos, e têm elevado número de micronemas e grânulos de amilopectina (Figura 2)^{32,78}. Os bradizoítos são morfológicamente mais estreitos e biologicamente menos sensíveis à destruição por enzimas proteolíticas do que os

taquizoítos, ao resistirem pelo menos duas horas, após utilização destas enzimas, enquanto que os taquizoítos são destruídos imediatamente⁴⁸. Os bradizoítos também contêm, grandes vacúolos citoplasmáticos que servem de reserva a hidratos de carbono e são o único estágio parasitário que pode dar origem ao ciclo entero-epitelial transformando-se em oocistos, nos hospedeiros definitivos.

No hospedeiro definitivo, a seguir à libertação dos bradizoítos, ocorre o ciclo entero-epitelial, pela invasão das células epiteliais do intestino delgado. Após várias transformações morfológicas, estas formas parasitárias levam à formação das formas gametogónicas e oocísticas. Os bradizoítos, antes de originarem os gâmetas, crescem no interior das células epiteliais do intestino delgado sob cinco tipos morfolologicamente diferentes, que Dubey e Frenkel em 1972 designaram por A, B, C, D e E³². Os gametócitos encontram-se em todo o intestino delgado, mas principalmente, no íleo, três a 15 dias p.i.. Dentro das células do epitélio intestinal, localizam-se afastados dos núcleos. O gâmeta feminino (macrogâmeta) tem uma morfologia esférica e contém um único núcleo com localização central e muitas granulações PAS positivo. Estruturalmente apresenta um conóide, vários microsporos, retículo endoplasmático, mitocôndrias, vesícula com dupla membrana e elementos precursores dos septos (*wall-forming bodies*). As estruturas com dupla membrana situam-se nas proximidades do núcleo e derivam, provavelmente, dele próprio³². Por sua vez, o gâmeta masculino (microgâmeta) é um microrganismo biflagelado, achatado lateralmente, sendo constituído, principalmente, por material nuclear. Na extremidade anterior, existe uma estrutura afilada (*perforatorium*) na qual se encontram os corpos basais, organóides de onde surgem os dois flagelos livres. À frente do núcleo, existe uma grande mitocôndria e ao longo dele dispõem-se cinco microtúbulos que podem representar o rudimento de

um terceiro flagelo que existe noutros coccídeos. Os gametócitos masculinos estão em número reduzido, constituindo 2-4% da totalidade da população gametocítica madura³².

Após o desenvolvimento dos gâmetas, os microgâmetas movimentam-se em direcção do macrogâmeta maduro, com o qual se conjugam, levando à formação de um zigoto diplóide, o oocisto, ao nível das células do epitélio do intestino. Estas formas são semi-esféricas ou esféricas com cerca de 10 a 12 µm de diâmetro. Após atingirem a maturidade, são libertadas no lúmen intestinal por ruptura das células do epitélio do intestino³². De seguida, os oocistos formados vão ser excretados com as fezes dos hospedeiros definitivos para o exterior, para que ocorra a esporulação. Este processo acontece um a cinco dias após a eliminação dos oocistos, no exterior, sob condições atmosféricas específicas de oxigenação, temperatura e humidade. Após esporulação, estas formas parasitárias tornam-se infecciosas para os hospedeiros definitivos e intermediários. Esta capacidade de serem infecciosas poderá manter-se durante meses mesmo em climas secos ou frios^{32,48}.

Os oocistos esporulados, de morfologia semi-esférica ou elipsóide, têm cerca de 11 a 13 µm de diâmetro, contendo cada oocisto esporulado dois esporocistos elipsóides e medindo cada um destes 6 a 8 µm (Figura 3). Por sua vez, cada um destes esporocistos contém quatro esporozoítos, que possuem um núcleo excêntrico ou central e uma pequena quantidade de granulações PAS positivo. Quando observado em microscopia electrónica, o esporozoíto é semelhante ao taquizoíto, excepto no que se refere ao número elevado de micronemas e de roptrias evidenciado no primeiro³² (Figura 2).

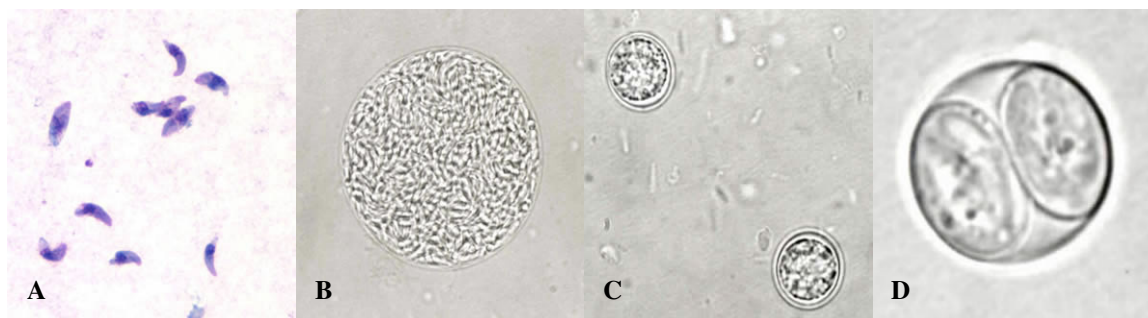


Figura 3. A. Taquizoítos de *T. gondii*; B. Quisto tecidular de *T. gondii*; C. Oocistos de *T. gondii* não esporulados; D. Oocisto de *T. gondii* esporulado. (Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/> acedido pela última vez a 20 de Dezembro de 2008).

Genoma

O protozoário *T. gondii* tem genoma haplóide durante toda a fase do seu ciclo assexuado, sendo diplóide apenas durante a formação do zigoto (oocisto), na fase sexual, que ocorre nas células do epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos. O genoma total tem cerca de 8×10^7 pares de base (pb), e 36 kilobase (kb) de *desoxirribonucleic acid* (DNA) mitocondrial circular⁴⁸, que está distribuído por 14 cromossomas⁵².

O genoma de *T. gondii* ainda não foi sequenciado na sua totalidade. Existem várias organizações que o estão a fazer, como *The Institute for Genomic Research* (TIGR), que tem a seu cargo a sequenciação de todo o genoma do parasita, com a colaboração de vários investigadores, e o *Sanger Institute* que está a sequenciar o cromossoma 1. No entanto, já é possível ter acesso a versões preliminares das sequências de três estirpes de toxoplasma (ME49, GT1, VEG) e dos cromossomas Ia e Ib da estirpe RH através do *ToxoDB*. O *ToxoDB* é uma base de dados genómica que

incorpora dados de sequenciações e que está interligado com outras bases de dados, incluindo informações cedidas pela comunidade (<http://ToxoDB.org>).

Epidemiologia

A toxoplasmose é uma infecção de distribuição mundial. Existem, contudo, diferenças epidemiológicas, nos vários locais geográficos e entre os grupos populacionais num mesmo local, que poderão ser explicadas pelas diversas vias de exposição ao parasita. Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada⁶⁴. Segundo Dubey, poderá variar entre 16% a 40% nos Estados Unidos da América (E.U.A.) e no Reino Unido; e no Centro e Sul da América e Europa, entre 50 a 80%⁴³. Em Portugal, o primeiro trabalho relevante sobre toxoplasmose intitulado “Contribuição para o estudo da toxoplasmose em Portugal” foi elaborado por Carvalho Araújo, em 1964, tendo obtido uma prevalência de 75,9% em diferentes grupos populacionais, pela utilização do *dye test*^{6,57,60}. Em 1983, Ângelo determinou a prevalência de anticorpos anti-toxoplasmose, na população continental e nos respectivos grupos etários, utilizando a técnica de imunofluorescência indirecta em 1675 soros humanos. Verificou a presença de anticorpos anti-toxoplasma em 47% da totalidade dos soros estudados, indicando que o risco de primo-infecção, no país, ocorre até aos 30 anos, predominantemente entre os 8 meses e os 15 anos de idade⁴. Em 1984, Antunes, no seu estudo sobre a infecção congénita da região de Lisboa, refere que a prevalência da toxoplasmose em mulheres grávidas, desta região, era de 64,3% (no total de 686 grávidas), e que 6 mulheres em cada 1000 grávidas adquirem a toxoplasmose no decurso da sua gestação e 50% delas (3 mulheres em cada 1000) geram um filho com toxoplasmose congénita⁶. Em 1994, foi feito um estudo epidemiológico de prevalência

da toxoplasmose numa população hospitalar, da zona centro do país, pelo teste de aglutinação em latex, tendo sido encontrada uma seroprevalência de anticorpos anti-toxoplasma de 59,2%, num total de 409 indivíduos⁶⁶. Em 2003, Ângelo refere que a prevalência da toxoplasmose varia entre 35% no sul a 70% no norte do país, ocorrendo 11 casos de toxoplasmose congénita em cada 10000 nascimentos, existindo 124 casos de toxoplasmose congénita por ano⁵.

Transmissão

Ao longo dos anos, vários estudos foram desenvolvidos, sobre as potenciais vias de transmissão de *T. gondii* para os hospedeiros, no entanto, ainda não foi possível evidenciar a que tem maior importância do ponto de vista epidemiológico⁷⁵, uma vez que as manifestações da doença não são distinguidas pela via de infecção e não existem ainda métodos de diagnóstico capazes de diferenciar a forma parasitária que originou a patologia⁵⁴.

Demonstrou-se que os hospedeiros, definitivos e intermediários, podem ser infectados por *T. gondii* pelas seguintes vias: ingestão de oocistos infecciosos (esporulados) provenientes das fezes dos gatos, a partir da água, de alimentos e do solo contaminados^{13,19,28}; ingestão de quistos na carne crua ou mal cozida^{16,29}; via congénita⁴³; transfusão sanguínea⁶⁹ e por transplante de órgãos e/ou de tecidos¹⁵, de dadores infectados com o parasita e mais raramente através do leite não pasteurizado³⁷. Na figura 4, estão representadas as potenciais vias de transmissão do parasita aos hospedeiros. A importância relativa destas vias de transmissão varia de região para região, dependendo da dieta, hábitos culinários, prevalência de hospedeiros definitivos infectados e técnicas de produção animal⁷⁶. A transmissão de *T. gondii* poderá ocorrer

pela contaminação com as três formas parasitárias infecciosas, contudo, os taquizoítos, apesar de infecciosos, são menos resistentes às secreções gástricas, sendo menos infecciosos pela via oral do que os oocistos ou os bradizoítos.



Figura 4. Principais vias de transmissão de *T. gondii* aos hospedeiros definitivos e intermediários.

Importância da carne na transmissão de *T. gondii*

Ao longo dos anos, o consumo de carne infectada com quistos de *T. gondii*, assumiu especial importância nos vários estudos epidemiológicos realizados^{16,50}. No maior estudo Europeu caso-controlo, sobre as fontes de transmissão de *T. gondii* para as grávidas, a carne mal cozida e os enchidos foram descritos como responsáveis por cerca de 30-60% das infecções agudas¹⁶. Estudos serológicos e moleculares evidenciaram a

disseminação da toxoplasmose nos animais utilizados na alimentação, particularmente nos suínos, caprinos e bovinos^{23,75}. Destes animais, os suínos domésticos (*Sus domesticus*) foram considerados os mais importantes na transmissão de *T. gondii* aos humanos^{23,26}. Dos estudos realizados, para determinar as fontes com maior relevância na transmissão de *T. gondii* para os suínos, destacou-se que a ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos, provenientes das fezes dos gatos, bem como a ingestão de quistos nos alimentos ou nos roedores infectados, são as principais fontes de contaminação, para estes animais^{56,78} (Figura 4). Destas vias, a contaminação com oocistos, pela ingestão de alimentos ou água, foi referida como a que tem maior importância⁵⁶. Esta situação poderá dever-se ao facto dos oocistos serem bastante resistentes às condições ambientais, sendo capazes de sobreviver durante meses sob condições adversas²⁷. Uma vez que a toxoplasmose nos suínos é geralmente assintomática, dificulta a rejeição dos animais, aquando o abate nos matadouros.

Para calcular o risco dos consumidores, inerente ao consumo de carne de suíno infectada por *T. gondii*, foram realizados alguns estudos para determinar a prevalência e a viabilidade de *T. gondii* nos suínos, e tal como nas infecções humanas, foram obtidos valores bastante diferentes nos vários países e entre as suas regiões. Em Portugal, a infecção dos suínos foi estudada em 1984, por Antunes, quando efectuou um estudo serológico, na região de Lisboa, em vários animais, tendo obtido uma seroprevalência de 6,9% nos 144 suínos, pela técnica de aglutinação directa⁶. Em 1992, Meireles obteve, no seu estudo serológico, a diferentes espécies animais de várias regiões do país, uma prevalência de 13,1% (total de 107 suínos)⁶⁰. Mais recentemente, em 2006, Sousa *et al.* obtiveram uma prevalência de 15,6% de anticorpos anti-*T. gondii*, por MAT, em 333

suínos de Vinhais (norte de país)⁷⁰. Neste mesmo estudo foi possível detectar parasitas viáveis em 15 dos 37 suínos com resultados positivos de serologia⁷⁰.

Estudos recentes demonstraram que as práticas de produção animal, de higiene, confinamento dos animais e prevenção, reduziram a prevalência do parasita, nos suínos jovens, criados sob práticas de produção intensiva, em alguns países Europeus e nos E.U.A.⁷⁵. Por sua vez, os animais mais velhos, que são usualmente criados por produção extensiva, estando mais expostos ao ambiente, apesar de também terem tido uma diminuição ligeira da seroprevalência, continuam a ser aqueles que apresentam uma prevalência mais elevada de toxoplasmose⁷⁵. Estes animais assumem especial importância na produção de enchidos, já que são os mais utilizados neste tipo de produtos. Para além disso, os enchidos são normalmente produzidos com carne proveniente de vários animais e geralmente são ingeridos crus, aumentando o risco da infecção^{8,54}. Recentemente, no Brasil, demonstrou-se a presença de parasitas *T. gondii* viáveis em enchidos frescos adquiridos em superfícies comerciais²¹. Parasitas viáveis foram também detectados num produto, no total de 67 enchidos, analisados no Reino Unido⁷⁷.

Características de resistência e sobrevivência dos quistos

Foram estudados procedimentos para destruir ou inviabilizar os bradizoítos de *T. gondii* da carne e dos seus derivados. Estas formas parasitárias, apesar de serem menos resistentes às condições ambientais do que os oocistos, são bastante resistentes às enzimas digestivas, facilitando a transmissão do parasita por via oral. Quando refrigerados (1-4 graus Celsius (°C)) na carne até cerca de três semanas, os bradizoítos

de *T. gondii* são relativamente resistentes às alterações de temperatura, permanecendo infecciosos, provavelmente durante o tempo em que a carne é usada na alimentação humana. São resistentes ao congelamento entre as temperaturas de -1 a -8°C, por mais de uma semana e apesar da maioria ser morta a temperaturas de -12°C ou mais baixas, ocasionalmente podem sobreviver a congelamentos extremos³¹. Podem ser mortos, quando aquecidos a uma temperatura de 67°C, estando a sua sobrevivência, a temperaturas mais baixas, dependente do tempo de exposição. Por exemplo, os quistos são viáveis a uma temperatura de 52°C durante 9,5 minutos (min), no entanto a 58°C durante 9,5 min são inviáveis³¹. Apesar de geralmente se tornarem inviáveis a temperaturas superiores a 61°C, durante 3,6 min, constatou-se a sua viabilidade a 64°C durante 3 min³¹. O efeito do armazenamento dos tecidos infectados com quistos de *T. gondii*, com diferentes concentrações de solução de cloreto de sódio (NaCl), a diferentes temperaturas, foi estudado por Dubey, verificando que geralmente a uma concentração de 6%, a qualquer temperatura, os quistos se tornam inviáveis²⁴. No entanto, podem sobreviver com uma concentração de sal mais baixa, durante semanas²⁴, tempo esse que pode não ser suficiente para evitar a transmissão. Estes resultados demonstraram que a utilização de NaCl, na preservação dos enchidos, poderá não ser eficaz na inviabilidade do parasita.

Dubey verificou também, que quistos de diferentes estirpes de *Toxoplasma gondii*, se tornam inviáveis a uma radiação gama de 0,4 Kilo Gray, independentemente da temperatura³⁴. Em alguns países, já é possível utilizar a radiação na carne para destruir os quistos, como por exemplo nos E. U. A.⁷⁵.

Patologia

A patologia desencadeada pela infecção por *T. gondii* designa-se toxoplasmose e evolui habitualmente segundo três fases sucessivas (Figura 5).

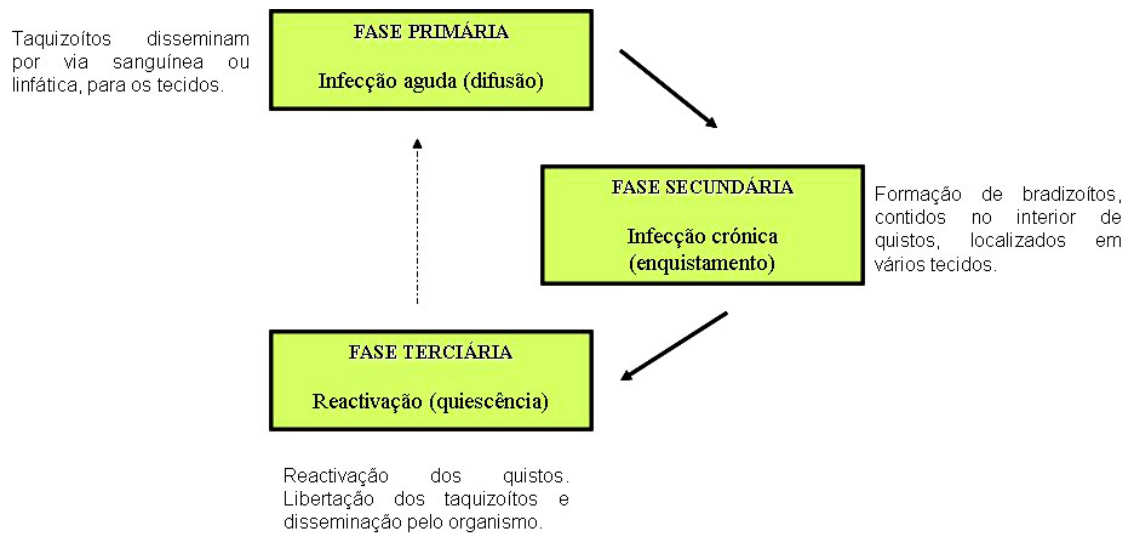


Figura 5. Evolução da toxoplasmose nos hospedeiros intermediários (humanos).

A toxoplasmose caracteriza-se por ser uma doença oportunista. O sistema imunitário competente consegue normalmente controlar a infecção¹⁰, traduzindo-se, em 90% dos casos, por infecções assintomáticas nos imunocompetentes⁵⁵. Quando a infecção é sintomática, no imunocompetente, a sua expressão clínica pode ser variada e pouco específica, embora na maioria das vezes se traduza por linfadenopatias, forma mais habitual, ou por um quadro febril com ou sem adenopatias^{7,62}. Situações mais invulgares podem surgir tais como: exantema, hepatite, miocardite, pneumonia atípica, encefalomielite ou meningite^{7,55}. Por sua vez, o parasita tem a capacidade de originar quadros severos nas infecções congénitas e nos indivíduos imunocomprometidos, surgindo como uma causa importante de morbilidade e mortalidade.

A toxoplasmose congénita é geralmente a consequência de uma infecção primária materna, durante a gravidez⁵⁵. O mecanismo da transmissão vertical ainda não é conhecido, todavia, sabe-se que o feto é contaminado pela passagem de taquizoítos por via transplacentar. A severidade da doença depende da competência imunológica da progenitora, do número e da virulência dos parasitas transmitidos ao feto e do tempo de gestação no momento da transmissão⁷⁵. O risco de transmissão da toxoplasmose ao feto aumenta proporcionalmente com o tempo de gestação, diminuindo, contudo, a gravidade da doença^{7,35,55,75}. O risco de infecção durante o terceiro trimestre de gravidez pode ser superior a 60%, no entanto, infecções severas, nesta altura da gestação, são muito raras³⁵.

Cerca de 60% dos casos de toxoplasmose congénita são subclínicos³⁵ contudo, poderá traduzir-se pelo aborto ou morte neonatal, em cerca de 10% dos das infecções pré-natais⁷⁵, ou por anomalias fetais com consequências graves para o recém-nascido como os sintomas da tríade clássica da toxoplasmose: retinocoroidite (90% dos casos), calcificações cerebrais (69% dos casos), perturbações neurológicas (60% dos casos) e ocasionalmente hidrocefalia ou microcefalia (50% dos casos)⁷. Outros sintomas, inespecíficos, poderão surgir, tais como: convulsões, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, febre, entre outros⁷. Uma vez que existe uma forte prevalência de casos assintomáticos de toxoplasmose congénita, a ausência de tratamento dos recém-nascidos poderá traduzir-se por manifestações tardias da doença, como a retardação mental e outras deficiências mentais.

Nos imunocomprometidos, a infecção poderá ser primária ou surgir pela reactivação das formas latentes (bradizoítos). Em situações de depressão imunológica, como no caso dos doentes transplantados, oncológicos e VIH-positivos, poderá ocorrer

a reactivação de uma infecção latente pela ruptura dos quistos com a libertação das formas vegetativas do parasita, que se multiplicam e disseminam rapidamente originando os taquizoítos^{55,62}. O mecanismo subjacente a esta reactivação das formas latentes é ainda desconhecido.

Nos doentes transplantados, o grau de imunossupressão subjacente e o tipo de órgão e/ou tecido transplantado (exemplo medula óssea), têm um papel fundamental no risco de contaminação de *T. gondii*. Uma vez que estes doentes podem adquirir a doença pela transmissão do parasita de um dador infectado ou pela reactivação das formas latentes, que não são controladas pela existência de uma imunodeficiência que se deve ao uso de imunossupressores. Existem órgãos mais propensos à transmissão do parasita, como o coração e os pulmões, dado o tropismo dos quistos para estes tecidos. No caso da medula óssea, ocorre geralmente a reactivação das formas parasitárias, pelo elevado grau de imunossupressores administrado³.

Os doentes oncológicos também são susceptíveis de adquirirem formas sintomáticas graves de toxoplasmose, resultante das terapêuticas agressivas (quimioterapia e radioterapia) que, muitas vezes deprimem o seu sistema imunitário. A patologia nestes doentes é semelhante à dos doentes com sida, pela reactivação dos quistos latentes, presentes nos tecidos, por um processo multifocal³. Num estudo efectuado por Miranda *et al.*, em 1992, onde foram avaliados os aspectos clínicos, imunológicos, neurorradiológicos e terapêuticos da toxoplasmose cerebral em 20 doentes infectados pelo VIH, foi possível verificar que as cefaleias e as alterações do SNC foram as manifestações clínicas mais frequentes nos doentes estudados⁶². Estimou-se que cerca de 10-50% dos doentes VIH-positivos infectados com toxoplasmose desenvolvem um quadro cerebral⁵⁹, dos quais 40% adquirem encefalite severa⁷⁵ e cerca de 10-30% dos pacientes com sida acabam por morrer devido a esta parasitose⁴².

Virulência e diferenças nas estirpes

A possibilidade do genótipo influenciar a severidade da doença é suportada pelas diferenças de virulência observadas nos modelos animais experimentais. A virulência das estirpes de *T. gondii* tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, tradicionalmente, através de estudos de susceptibilidade nos modelos animais (como os murganhos) e por estudos *in vitro* de invasão, tempo de multiplicação e produção de quistos⁴⁸. Hoje em dia, esse estudo é feito sobretudo por ensaios imunoenzimáticos, análise isoenzimática e molecular.

Apesar da presença de uma fase sexual no ciclo de vida de *T. gondii*, exclusivo do hospedeiro definitivo, que pressupõe a existência de diversidade genética elevada, a genotipagem por *Restriction Fragments Length Polymorphism* (RFLP) e por análise de marcadores isoenzimáticos, revelou variação genética inferior à que seria de esperar^{18,68}. Foi então demonstrado que *T. gondii* tem uma estrutura clonal populacional constituída por três linhagens designadas usualmente por Tipo I, II e III, tanto nos humanos como nos animais⁴⁵. Estas estirpes perfazem na totalidade cerca de 95% das estirpes encontradas na América do Norte e na Europa^{12,41,45}. As restantes estirpes são designadas recombinantes, no caso de estarem relacionadas com um dos três genótipos dominantes¹² ou atípicas quando os genótipos são diferentes dos três principais.

Pensa-se que estes genótipos tenham sido originados pelo cruzamento de duas estirpes não parentais há cerca de 10000 anos, tendo originado uma rápida expansão clonal^{51,71}. Por outro lado, na América do Sul foi observada uma diversidade genética que, por estudos filogenéticos e fenotípicos permitiram concluir que a população do Norte e do Sul da América tenha divergido de um ancestral comum num período de 10⁶ anos⁵¹. Um estudo recente, no Brasil, confirmou essa diversidade genética,

demonstrando uma baixa expansão clonal do parasita no país, em contraste com as regiões do norte do continente⁶⁷.

A estrutura clonal populacional apresentada por *T. gondii*, observada na Europa e a diversidade genética verificada em alguns locais, têm várias implicações na compreensão da biologia e da patogenicidade do parasita, uma vez que membros de linhagens diferentes podem ter características biológicas muito variadas como o crescimento, infecciosidade, patogenicidade e virulência; indivíduos da mesma linhagem vão apresentar fenótipos semelhantes e finalmente, as diferenças fenotípicas vão ser mediadas pelas pequenas diferenças genéticas observadas entre as linhagens¹.

Vários investigadores têm tentado estabelecer uma correlação entre os genótipos de *T. gondii* com a evolução clínica da toxoplasmose. Apesar das reduzidas diferenças entre os genomas das três estirpes, entre 1-2%, estas têm manifestações clínicas bastante diferentes nos modelos animais. Assim, houve a necessidade de definir estirpes virulentas como sendo as que, após injeção intraperitoneal de 100 ou menos taquizoítos, causam sintomatologia aguda, levando à morte dos animais em apenas uma semana⁴⁶. Estas são geralmente caracterizadas pela dose letal absoluta de 100% (LD₁₀₀) que corresponde à concentração necessária que resulta na morte de todos os animais infectados com o parasita⁴⁵.

Com base em vários estudos, verificou-se que as estirpes do Tipo I são bastante virulentas para os murganhos, por terem uma LD₁₀₀ de apenas um organismo, produzindo elevados níveis de parasitemia. Uma destas estirpes de *T. gondii* é a RH, isolada em 1939 por Sabin, num rapaz de seis anos de idade. Esta estirpe, após ter sido inoculada em cérebros de murganhos, demonstrou ter uma virulência muito elevada, ao terem morrido todos os animais infectados até ao vigésimo primeiro dia p.i.. Desde o

momento em que esta estirpe foi identificada, permanece em cultura, em vários laboratórios, sofrendo várias passagens, sem ter sido detectada perda de virulência para os murganhos. As estirpes do Tipo I são mais frequentemente associadas a toxoplasmose congénita³⁶ e a infecções em doentes com retinocoroidite⁴¹. Estas estirpes são predominantes nas infecções humanas e animais na América do Sul, nomeadamente no Brasil³⁸.

Por sua vez, as estirpes do Tipo II têm uma LD₁₀₀ igual ou superior (\geq) a 10³ taquizoítos, apresentando portanto, uma virulência bastante mais baixa, do que as do Tipo I, sendo geralmente responsáveis por infecções crónicas^{68,72}. As estirpes do Tipo II estão associadas à maioria das infecções humanas e animais da América do Norte e da Europa^{44,45}. Estão também relacionadas com a maioria das infecções dos doentes com sida⁴⁴. Contudo, apesar de serem pouco virulentas nos murganhos, são capazes de originar complicações graves nos humanos, evidenciando uma associação entre a severidade da doença e os factores específicos dos hospedeiros, que influenciam a interacção parasita-hospedeiro. Os factores responsáveis pela prevalência destes parasitas na infecção humana ainda não são conhecidos, contudo, pensa-se que possam estar associados ao sistema imunitário, à via de exposição ou a adaptações parasitárias que permitiram a estas estirpes causar infecção nos humanos com sucesso¹.

Tal como as estirpes do Tipo II, as do Tipo III foram referidas por terem uma virulência bastante mais baixa do que as do Tipo I, com uma LD₁₀₀ de $\geq 10^3$ taquizoítos, nas infecções da América do Norte e Europa, podendo ser encontradas nos animais e nas infecções humanas destas regiões. No entanto, na América do Sul, estas estirpes demonstraram ter uma virulência maior para os murganhos.

A discriminação do genótipo de *T. gondii* é geralmente feita pelo estudo do *locus* do gene do antígeno de superfície 2 (SAG2), que codifica a proteína de superfície p22 do taquizoíto. Pensa-se que a família de proteínas, onde p22 está inserida, tenha um importante papel na invasão celular, na modulação da resposta imunológica e na virulência, podendo também contribuir para a protecção de que o parasita necessita para sobreviver no meio ambiente⁵⁸. O *locus* SAG2 é ideal, segundo Howe, para a tipificação das estirpes do parasita, por conter os vários polimorfismos específicos de cada linhagem⁴⁵. Adicionalmente, as variações nucleotídicas presentes no DNA das estirpes podem ser detectadas rapidamente, neste único *locus*, pela técnica RFLP ou por outras técnicas, como a *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), microsátélites e sequenciação. A técnica de RFLP é uma das que tem sido mais utilizada, por permitir detectar rapidamente os polimorfismos dos genótipos pela constatação da presença ou ausência de locais de restrição específicos para as enzimas de restrição. A sequenciação assume especial importância na detecção e caracterização de genótipos atípicos ou recombinantes, pela identificação de inserções/delecções e substituições de nucleotídeos no genoma.

Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser estabelecido indirectamente por testes serológicos ou directamente por testes moleculares, histológicos ou isolamento do parasita. Os sintomas não são específicos, nem suficientemente característicos para um diagnóstico definitivo⁴³.

A serologia é vastamente utilizada no diagnóstico da toxoplasmose, existindo vários métodos que permitem detectar anticorpos anti-*T. gondii*. O primeiro teste disponível, para detectar e quantificar anticorpos específicos anti-*T. gondii*, foi a reacção de Sabin-Feldman (*dye test*), em 1948. Nesta reacção, é visualizada a lise dos parasitas na presença de amostras de soro que contêm anticorpos anti-toxoplasma, pela activação do complemento. Este complexo ao não ser corado com azul de metileno alcalino ($-\log[H^+]$ (pH) a 11), ao contrário do que sucede com o soro isento de anticorpos, permite melhorar a interpretação dos resultados⁶. Actualmente, o *dye test*, ainda é considerado o *gold standard*, por ter elevadas taxas de sensibilidade e especificidade. No entanto, por utilizar toxoplasmas vivos obtidos por passagens repetidas e frequentes, traz alguns problemas de biosegurança.

O desenvolvimento das técnicas de imunofluorescência, aglutinação e hemaglutinação, bem como da *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), entre outras, permitiu o aparecimento de vários testes comerciais para a detecção de anticorpos específicos anti-*T. gondii*. Entre elas, o *modified agglutination test* (MAT) é um teste que pode ser utilizado para a detecção e quantificação das imunoglobulinas G (IgG), tendo níveis de sensibilidade e especificidade semelhantes aos do *dye test*^{20,25}. Este teste baseia-se na aglutinação do antígeno com as imunoglobulinas IgG, quando presentes no soro diluído. A utilização de um tampão de diluição com 2-Mercaptoetanol (2-ME) permite eliminar aglutinações não específicas, pela desnaturação das imunoglobulinas M (IgM), por destruição das pontes dissulfureto.

Geralmente, os anticorpos IgM específicos podem ser detectados durante as duas primeiras semanas p.i.. Atingem títulos de concentração máxima (“pico”) entre o

primeiro mês e depois decrescem, persistindo em média quatro meses, tornando-se indetectáveis ao fim de alguns meses. Por sua vez, o título dos anticorpos IgG aumenta mais lentamente, atingindo uma concentração máxima aos dois meses. Estes mantêm-se elevados e estáveis durante vários meses ou anos, podendo diminuir, mas sem desaparecerem por completo (Figura 6). Contudo, poderá não existir produção de anticorpos IgM específicos, nas primeiras semanas da parasitémia e/ou títulos elevados destes anticorpos poderão persistir durante meses p.i. dificultando a interpretação dos resultados dos testes serológicos⁴³. Por outro lado, um título elevado de anticorpos específicos não pode ser associado com a sintomatologia, uma vez que a maioria das infecções nos humanos são assintomáticas⁴³.

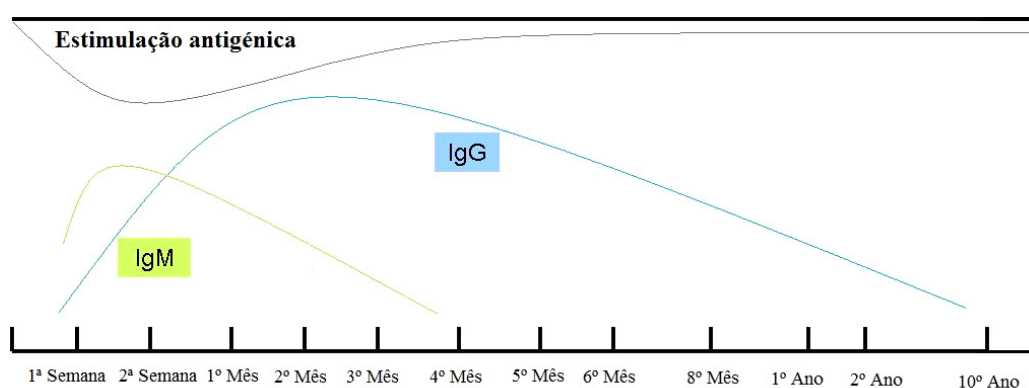


Figura 6. Cinética dos anticorpos anti-*T. gondii* (Adaptado de Antunes, F., 1984⁶).

Na toxoplasmose congénita, poderá ocorrer a passagem de anticorpos IgG maternos para o feto, alterando o perfil de evolução dos anticorpos. Desta forma, estas imunoglobulinas podem estar aumentadas no recém-nascido sem contudo, significarem, necessariamente, infecção congénita. Podendo tratar-se apenas de anticorpos passivamente transmitidos da mãe para o feto, tanto mais que a produção de IgG começa a verificar-se, habitualmente, a partir do terceiro ou quarto mês de vida⁶. No caso de infecção do feto, ocorre uma subida do título de anticorpos antitoxoplásmicos, a

partir dos quatro a seis meses, em oposição à curva descendente da taxa de anticorpos exibida pelo feto não infectado⁶.

Nos indivíduos imunocomprometidos, a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* deverá ser feita com extrema precaução, visto que, geralmente estes indivíduos foram infectados no passado, contendo assim títulos de anticorpos IgG.

Uma vez que os resultados dos métodos serológicos são por vezes difíceis de interpretar, nas infecções congénitas e nos imunocomprometidos, opta-se regularmente, no diagnóstico ou na confirmação dos resultados, pela conjugação dos métodos serológicos com a detecção directa de *T. gondii*. Tendo como vantagens: não dependerem da resposta do sistema imunitário e detectarem directamente o parasita nas amostras biológicas⁷³.

Os métodos moleculares baseiam-se, sobretudo, na detecção de DNA de *T. gondii*, que poderá ser feita pela amplificação de uma região do genoma, através da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). A PCR é uma técnica simples que permite a amplificação de uma região alvo de DNA, pela imitação do processo da replicação *in vitro* com base na alternância de temperaturas que promovem a desnaturação, ligação e a polimerização sob a acção de uma enzima DNA polimerase. Existe, no entanto, uma falta de padronização desta técnica no diagnóstico de *T. gondii*, sendo variável a sua *performance* (sensibilidade e especificidade), consoante o laboratório, por depender do método de extracção, da sequência do genoma escolhida para a amplificação, das sequências iniciadoras e das condições de reacção^{9,73}.

A primeira aplicação da técnica de PCR, neste parasita, foi feita com base na identificação do gene B1 por Burg *et al.*¹⁴. Este gene foi isolado e descrito por Boothroyd *et al.*, sendo considerado um alvo atractivo para a detecção do parasita *T.*

gondii por amplificação de DNA, pela sua natureza repetitiva (35 cópias do gene no genoma)¹⁴. Apresenta uma elevada especificidade e conservação nas estirpes testadas, incluindo isolados de pacientes com sida¹⁴. Desde então, foram vários os trabalhos em que se utilizou este gene para a detecção de *T. gondii*. Sendo referido, em alguns deles, como o gene mais específico e sensível para a amplificação de *T. gondii* de DNA^{47,79}.

Outras sequências alvo, de carácter repetitivo ou de cópia única, têm sido utilizadas, ao longo dos anos, para a detecção do parasita, tais como: o gene que codifica o maior antígeno de superfície P30, o gene da pequena subunidade ribossomal do ácido ribonucleico (rRNA), os genes que codificam os antígenos de superfície do taquizoíto: SAG1, SAG2, SAG3, SAG4 e GRA4, os genes de cópia única para a α e β tubulinas, entre muitos outros⁹.

A técnica de PCR revolucionou o diagnóstico da infecção intra-uterina, por permitir um diagnóstico precoce pela detecção do parasita a partir do fluido amniótico⁶⁴. Quanto mais cedo for feito o diagnóstico pré-natal, mais cedo se iniciará o tratamento, com menores complicações para o feto e para a progenitora. Nos imunocomprometidos o diagnóstico precoce também assume extrema importância, ao permitir a detecção do parasita no sangue, no tecido cerebral e nos fluidos do organismo (cerebroespinal, humor vítreo e aquoso, broncoalveolar, pleural, peritoneal, entre outros)⁴³.

O isolamento de *T. gondii* poderá ser feito pela inoculação de amostras de sangue ou de outros fluidos, tecidos ou órgãos, pré-tratados, em modelos animais de experimentação (geralmente nos murganhos). Quando se pretende diagnosticar infecções agudas, pela transmissão a partir dos taquizoítos, a sensibilidade deste método

de diagnóstico está dependente da escolha da técnica de inoculação, ao ser necessária a presença de parasitas vivos.

Os métodos histológicos permitem observar as formas parasitárias em fragmentos de tecidos ou de órgãos. A visualização de taquizoítos é rara e difícil uma vez que estas formas parasitárias têm uma morfologia semelhante a estruturas das células hospedeiras. Por sua vez, a observação dos bradizoítos no interior de quistos está limitada pela sensibilidade deste método, na medida em que os quistos podem estar presentes em quantidades muito reduzidas nas amostras⁴⁰. Foi referido que podem ser observados em quantidades inferiores a um quisto por 50 g de tecido^{33,79}. Por outro lado, a presença de bradizoítos não permite diagnosticar uma infecção activa, já que estas formas parasitárias estão presentes na fase de latência da doença.

Tratamento

A terapia actual é geralmente feita pela associação da pirimetamina (diaminopiridina) com a sulfadiazina (sulfadimidina). Estes fármacos têm uma actividade sinérgica bastante elevada no bloqueio da replicação do DNA de *T. gondii* através da inibição das enzimas dihidropteroato sintetase (DHPS) e a dihidrofolato reductase (DHFR). Estas enzimas são as principais responsáveis pela síntese dos folatos, que são essenciais para a sobrevivência e replicação do parasita. Uma vez que a DHFR também está presente nos humanos, a sua inibição pode induzir a deficiências de folatos, traduzindo-se por uma toxicidade hematológica grave⁶¹. Daí ser necessário a administração de ácido folínico para prevenir complicações severas associadas ao tratamento. Existem outros fármacos que podem ser utilizados no tratamento da

toxoplasmose como a espiramicina, clindamicina, atovaquona, entre outros. Contudo, os medicamentos disponíveis no mercado apenas promovem a morte das formas de multiplicação activa do parasita (taquizoítos), não actuando nos estádios crónicos da toxoplasmose (bradizoítos)⁴³.

A espiramicina é indicada para as grávidas com suspeita de toxoplasmose, adquirida ou diagnosticada, durante o primeiro trimestre ou no início do segundo trimestre da gestação. A combinação da pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico é indicada para as grávidas que foram diagnosticadas com toxoplasmose aguda, a partir do final do segundo trimestre de gestação (≥ 18 semanas). Esta combinação é também indicada para as situações em que foram detectadas anomalias no desenvolvimento fetal, pelo exame por ultrasons. A pirimetamina é teratogénica, pelo que, a sua utilização no primeiro trimestre é contra-indicada. Nos imunocomprometidos, a monoterapia não tem qualquer efeito, pelo que se utiliza geralmente a combinação da pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico^{64,65}. Uma vez que o tratamento actual não elimina as formas parasitárias de latência, deve adoptar-se uma terapia a longo prazo nos indivíduos imunocomprometidos, durante toda a vida ou até terminar a imunossupressão. Os efeitos tóxicos destes medicamentos combinados com a incapacidade de eliminar a infecção, levam à necessidade da produção de medicamentos mais eficazes¹⁰.

II - Objectivos

Este trabalho tem como objectivo geral contribuir para o conhecimento epidemiológico da infecção por *T. gondii* em Portugal, e como objectivos específicos:

1. Determinar a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soro de suínos (*Sus domesticus*) destinados ao consumo humano.
2. Detectar *T. gondii* no tecido cerebral e muscular de suínos (*Sus domesticus*) destinados ao consumo humano, e em produtos alimentares de carne de suínos (adquiridos em superfícies comerciais).
3. Caracterizar geneticamente as estirpes de *T. gondii* isoladas neste estudo.

III – Material e Métodos

3.1. Estudo serológico em suínos domésticos

Detecção e semi-quantificação de IgG anti-*T. gondii* em soro de suínos domésticos destinados à alimentação humana.

3.1.1. Amostra

As amostras de sangue foram obtidas de 381 suínos (*Sus domesticus*) abatidos no Matadouro Regional do Alto Alentejo (38 57N, 7 40W), Sousel, distrito de Portalegre, Portugal, entre Novembro de 2007 e Junho de 2008. O Matadouro Regional do Alto Alentejo tem como principal actividade o abate industrial de animais, dispondo para o efeito de três linhas de abate (bovinos, suínos e ovinos) licenciadas para trocas intra-comunitárias, e com capacidade de 10000 toneladas/ano. Os animais abatidos são provenientes de explorações com práticas de produção extensiva e intensiva, da região do Alto Alentejo. Dos 381 suínos, de ambos os sexos e de dois grupos etários (6 a 11 meses; ≥ 12 meses), 127 eram da raça Large White, criados sob práticas de produção intensiva e provenientes de quatro explorações (Quadro 1) e 254 eram da raça Alentejana criados sob práticas de produção extensiva e provenientes de 12 explorações (Quadro 2).

Quadro 1. Distribuição das amostras dos suínos da raça Large White por sexo e idade.

Espécie	Raça	Código da exploração	Número de amostras	Sexo		Grupo etário (meses)	
				Macho	Fêmea	6 a 11	≥ 12
<i>Sus domesticus</i>	Large White	VY10B	42	0	42	42	0
		VW73D	16	0	16	16	0
		VW11P	14	8	6	4	10
		VW69C	55	0	55	55	0
	Total	4	127	8	119	117	10

Quadro 2. Distribuição das amostras dos suínos da raça Alentejana por sexo e idade.

Espécie	Raça	Código da exploração	Número de amostras	Sexo		Grupo etário (meses)	
				Macho	Fêmea	6 a 11	≥12
<i>Sus domesticus</i>	Alentejana	VW73D	1	0	1	0	1
		VW11P	1	0	1	0	1
		VM27B	20	15	5	0	20
		WE72A	20	18	2	0	20
		RL17D	8	7	1	0	8
		WD40A	14	6	8	0	14
		VS02A	119	66	53	0	119
		VZ82A	40	26	14	0	40
		VD95H	1	0	1	0	1
		VJ48A	10	8	2	0	10
		VP61A	2	2	0	0	2
		VW076	8	8	0	0	8
		TC13J	10	10	0	0	10
	Total	12	254	166	88	0	254

Colheita de sangue

Recolheu-se cerca de 10 mililitros (mL) de sangue de cada suíno, por incisão de, pelo menos, uma das artérias carótidas ou dos vasos donde derivam, durante a linha de abate, após insensibilização por electronecrose ou inalação de dióxido de carbono e pendura. As amostras foram transportadas até ao laboratório devidamente acondicionadas em geleiras térmicas. Para a obtenção do soro, o sangue total foi centrifugado (Eppendorf, centrifuge 5403) a 1300 - campo gravitacional (g), durante 15 min. O soro obtido foi armazenado a uma temperatura de -20 °C na arca frigorífica até posterior processamento.

3.1.2. Toxo-Screen DA

Utilizou-se o *kit* comercial Toxo-Screen DA da bioMérieux® SA, para a detecção das IgG anti-*T. gondii* por aglutinação directa, com antígeno sensibilizado.

Princípio do teste:

Ocorre aglutinação do antígeno (estirpe RH) tratado com formol, na presença de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii*, quando presentes no soro diluído. A utilização de um tampão de diluição com 2-ME permite eliminar aglutinações não específicas, pela desnaturação das IgM. Segundo o fabricante, quando comparado com o *dye test*, este teste tem uma sensibilidade de 96,22% (intervalo de confiança de 95% [94,55%-97,39%]) e uma especificidade de 98,80% (intervalo de confiança de 95% [96,36%-99,60%]).

Procedimento

Na realização deste método, seguiram-se as indicações do fabricante. Todos os soros e controlos (positivo e negativo) foram previamente diluídos (1/20) com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Colocou-se 25 microlitros (μL) de 2-ME a 0,2 Mol por litro (mol/L), nas cúpulas da placa de reacção e de seguida 25 μL de cada diluição do soro nas cúpulas previstas. Adicionou-se 50 μL da suspensão de antígeno toxoplásmico diluído a 1/5. Efectuaram-se passagens de 25 μL nas três cúpulas seguintes, rejeitando 25 μL na última diluição de cada soro, obtendo-se as seguintes diluições: 1/40, 1/60, 1/180 e 1/540. Homogeneizou-se a placa num agitador eléctrico (Ika®, Schüttler MTS 2) durante 5 min. A placa foi coberta com uma folha autocolante tendo sido colocada na estufa (Heraeus), durante a noite, a 37°C, em atmosfera húmida, ao abrigo de desidratação e de vibrações.

Leitura e interpretação dos resultados:

A leitura dos resultados foi feita em contra luz. Considerou-se reacção positiva, quando se observou nas cúpulas uma aglutinação dos toxoplasmas sob a forma de véu, cobrindo aproximadamente metade do fundo da cúpula. Na ausência de aglutinado, aparecendo apenas uma sedimentação dos toxoplasmas em botão ou em anel, no fundo da cúpula, foi considerada reacção negativa. O limiar de detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* do teste utilizado é de 4 unidades internacionais por mililitro (IU/mL), obtendo-se o título de anticorpos pelo inverso da maior diluição que dá uma reacção positiva (Quadro 3).

Quadro 3. Correspondência entre a diluição e o título em anticorpos (IU/mL).

Diluição	1/40	1/60	1/180	1/540
Título (IU/mL)	4	6	18	54

Em cada série de testes, testou-se um controlo de qualidade positivo e um negativo. Para validar o ensaio, o soro positivo teve que ser positivo na diluição de 1/40, e o soro negativo teve que se encontrar sistematicamente negativo. Se os resultados dos soros controlo não estivessem em conformidade com as instruções do fabricante, a série não seria validada.

3.2. Detecção genética de *T. gondii*

Detecção de DNA de *T. gondii* em suínos domésticos e em produtos transformados de carne de suínos, destinados à alimentação humana.

3.2.1. Amostra

A 218 animais, provenientes de oito explorações de produção animal do Alto Alentejo, utilizados na recolha de sangue para a análise serológica, foram recolhidas 218 amostras de tecido muscular (diafragma) e a 122 dos 218 animais foram ainda recolhidas amostras de tecido nervoso (encéfalo) (Quadro 4). Destas amostras de tecido, foram utilizadas para a detecção do DNA de *T. gondii*, todas aquelas cujos animais apresentaram resultados positivos de serologia (19 amostras de diafragma e 15 amostras de encéfalo provenientes de 19 suínos). E ainda cerca de $\geq 20\%$ dos animais de cada exploração com resultados negativos de serologia, num total de 42 animais (Quadro 5).

Dez produtos transformados de carne de suíno, de fabrico tradicional, produzidos com carne da região do Alto Alentejo, adquiridos em diferentes superfícies comerciais, foram utilizados para o rastreio de DNA de *T. gondii* (Quadro 6).

Quadro 4. Distribuição das amostras recolhidas de tecidos muscular e nervoso de suínos.

Espécie	Código da exploração	Número de animais	Raça		Tecido	
			Large White	Alentejana	Diafragma	Encéfalo
<i>Sus domesticus</i>	VY10B	41	41	0	41	41
	VM27B	20	0	20	20	20
	VE72B	20	0	20	20	20
	RL17D	8	0	8	8	0
	VD40A	14	0	14	14	1
	VZ82A	40	0	40	40	40
	VS02A	73	0	73	73	0
	VD95H	2	0	2	2	0
Total	8	218	41	177	218	122

Quadro 5. Distribuição das amostras de tecido muscular e nervoso de suínos com resultados negativos de serologia, submetidos à amplificação por PCR para detecção de DNA de *T. gondii*.

Espécie	Código da exploração	Número de animais	Animais com resultados negativos de serologia	Animais com resultados negativos de serologia utilizados		Tecido	
				Total	%	Diafragma	Encéfalo
<i>Sus domesticus</i>	VY10B	41	37	8	21,6	8	8
	VM27B	20	10	2	20,0	2	2
	VE72B	20	20	4	20,0	4	4
	RL17D	8	8	2	25,0	2	0
	VD40A	14	14	3	21,4	3	1
	VZ82A	40	39	8	20,5	8	8
	VS02A	73	69	14	20,3	14	0
	VD95H	2	1	1	100	1	0
Total	8	218	198	42	21,2	42	23

Quadro 6. Distribuição das amostras recolhidas de enchidos de suínos.

Código de amostragem	Enchido
Ench1	Chouriço Biológico de Porco Preto
Ench2	Chouriço de Carne de Porco Preto
Ench3	Painho de Porco Preto
Ench4	Chouriço Tradicional de Porco Preto
Ench5	Chouriço Receita Tradicional Alentejana
Ench6	Morcela de Porco Preto
Ench7	Farinheira de Porco Preto
Ench8	Chouriço Receita Tradicional Alentejana
Ench9	Chouriço de Carne de Porco Preto
Ench10	Morcela de Porco Preto

Colheita das amostras

Durante a linha do abate dos suínos, na fase da “evisceração” e corte longitudinal dos animais (meias carcaças), foi feita a colheita de cerca de 200 gramas (g) de tecido muscular (diafragma) para recipientes esterilizados. Na fase da

“desmancha e desossa”, foi efectuada a recolha de cerca de 200 g de tecido nervoso (encéfalo) dos animais para recipientes esterilizados. Estas amostras foram transportadas para o laboratório devidamente acondicionadas em geleiras térmicas e mantidas a uma temperatura de -20°C, na arca frigorífica, até serem processadas.

Os produtos alimentares utilizados, transformados a partir da carne de suínos, foram seleccionados de acordo com a origem da carne (regiões do Alto Alentejo). Estas amostras, após transporte para o laboratório nas embalagens originais, foram congeladas a uma temperatura de -20°C, na arca frigorífica, em recipientes esterilizados, até posterior processamento.

Preparação das amostras

Aos tecidos e produtos de carne, descongelados à temperatura ambiente, retiraram-se cerca de 100 g para um recipiente esterilizado. Posteriormente, adicionou-se 100 mL de tripsina às amostras e após homogeneização no vortex (Velp Scientifica, ZX3), foram incubadas a 37°C, na estufa, durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram novamente homogeneizadas no vortex e após filtração com gaze, adicionou-se-lhes 3 mL de PBS, seguindo-se três centrifugações a 2600 g durante 10 min. Este processo foi repetido três vezes, tendo-se utilizado o sedimento formado na última centrifugação para a extracção de DNA.

3.2.2. Extracção de DNA de *T. gondii*

Na extracção de DNA de *T. gondii*, utilizou-se o método de Mini-Beadbeater/Sílica^{2,11}.

O método é composto por quatro fases. Inicialmente, promove-se o rebrandamento celular e a lise dos oocistos por acção mecânica e química. De seguida, após um período de agitação constante, pela forte afinidade do DNA para as partículas de sílica, ocorre a sua adsorção a estas, saindo da solução. Após várias lavagens, por forma a eliminar possíveis contaminantes e partículas de interferência, que se encontrem adsorvidos à sílica, é feita a eluição do DNA da sílica para a água.

Procedimento

A lise dos oocistos é feita a partir de 400 µL do tecido pré-tratado ao qual se adiciona 900 µL de tampão de lise (tiocianato de guanidina (Sigma-Aldrich®) 7 Molar (M); Tris(hidroximetil)aminometano-cloreto de hidrogénio (Tris-HCL) 50 milimolar (mM) com pH 6,4; Ácido Etilenodiamino Tetracético (EDTA) 25 mM pH 8,0; Triton X-100 (Serva Electrophoresis GmbH®; 1,5% volume/volume, v/v), 60 µL de álcool isoamílico e 0,3 g de partículas de zircónio (Biospec Products) com 0,5 milímetros (mm) de diâmetro. Agitou-se à velocidade máxima, durante 2 min no aparelho Mini-Beadbeater (Biospec Products) e de seguida centrifugou-se à velocidade de 20200 g, durante 15 segundos (seg), para a sedimentação dos detritos e das partículas de zircónio. O sobrenadante foi transferido para um tubo de plástico de 1,5 mL.

A adsorção do DNA foi obtida pela adição ao sobrenadante de 40 µL de uma suspensão de sílica em pó (Sigma-Aldrich®, 1% pH 2,0), seguida de uma agitação vigorosa e incubação à temperatura ambiente, sob agitação constante no agitador rotativo (Fröbel Labortechnik GmbH) durante 1 hora (h) e 30 min. A sílica com o DNA adsorvido foi sedimentada por centrifugação, durante 15 seg.

Cada lavagem consistiu na ressuspensão da sílica da solução e centrifugação à velocidade de 20200 g, durante 15 seg. Foram efectuadas duas lavagens com 200 µL de

tampão de lavagem (tiocianato de guanidina 7 M, Tris-HCL 50 mM pH 6,4), seguidas de uma lavagem com 200 µL de etanol a 80%. De seguida, lavou-se uma vez com 200 µL de acetona absoluta e após desprezar a acetona, incubou-se a 55 °C, no aparelho Block Heater (Stuart Scientific) até à evaporação completa do solvente.

A sílica foi ressuspensa com 50 µL de água destilada ultra pura e incubada a 55°C, no aparelho Block Heater, durante 10 min, para facilitar a eluição do DNA. De seguida, sedimentou-se a sílica por centrifugação à velocidade de 20200 g, durante 2 min e recolheu-se o sobrenadante com o DNA dissolvido, o qual foi guardado na arca frigorífica a uma temperatura de -20 °C, até posterior processamento.

3.2.3. *Nested-PCR* do gene B1 de *T. gondii*

Após extracção de DNA nas amostras, foi feita a pesquisa de *T. gondii*, pela reacção de *nested-PCR*. Para tal, utilizou-se o gene alvo B1. A reacção de *nested-PCR*, caracterizada por se dividir em duas fases de amplificação da sequência de DNA alvo, através de uma primeira amplificação seguida de uma segunda numa zona interna à primeira amplificada, foi feita pela utilização de dois conjuntos de sequências iniciadoras diferentes em cada reacção, um conjunto mais externo (1ª Parte) e outro mais interno (2ª Parte) (Quadro 7). Este tipo de reacção permite aumentar a sensibilidade e a especificidade nas reacções de amplificação.

Quadro 7. Sequências iniciadoras utilizadas nas reacções da *nested-PCR* para amplificação do gene B1 de *T. gondii*.

Sequências iniciadoras		Posição	Tamanho (pb)
ToxoFw1 (1ª Reacção)	5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'	694-714	21
ToxoRw1 (1ª Reacção)	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'	868-887	20
ToxoFw 2 (1ª Reacção)	5'-TGCATAGGTTGCAGTCACTG-3'	757-776	20
ToxoRw 2 (2ª Reacção)	5'-GGCGACCAATCTGCGAATACACC-3'	831-853	23

Procedimento

Na elaboração da mistura de reagentes, utilizada na amplificação do gene B1 para o volume final de 25 µL, adicionou-se 2,5 µL da solução tampão (Bioline, 10 vezes concentrado (x) amónio (NH₄)), 0,5 µL de cada 2'-desoxinucleotídeo-5'-trifosfato (dNTP) (AB) correspondente a 2 µL no total, 1 µL das sequências iniciadoras (MWG Biotech AG), 0,1 µL da enzima de polimerização BIOTAQTM DNA polymerase (Bioline), 0,5 µL de *Bovine Serum Albumine* (BSA) (Fermentas) e de dimetilsulfóxido (DMSO), 1,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Bioline), 3 µL da amostra, sendo o volume final preenchido com água destilada ultra pura (13,9 µL). A segunda reacção de amplificação foi feita com as mesmas quantidades e concentrações dos reagentes, à excepção da quantidade de amostra que foi de 4 µL, diminuindo-se a quantidade de água para 12,9 µL (Quadro 8).

Em todas as reacções de *nested*-PCR, foram utilizados controlos positivos (cedidos pelo Laboratório Nacional de Veterinária) e controlos negativos (água destilada ultra pura). Foram também testados controlos negativos compostos exclusivamente por tripsina e pelos reagentes utilizados no processo de extracção de DNA, para controlar a contaminação dos reagentes utilizados no pré tratamento das amostras e extracção de DNA.

Os produtos de amplificação foram guardados à temperatura de -20°C, na arca frigorífica, até visualização em gel de agarose, por electroforese.

Quadro 8. Composição da mistura reaccional da *nested*-PCR para amplificação do gene B1 de *T. gondii*.

Componentes	Solução de trabalho	Concentração necessária	Volume para 25 µL de reacção
Água esterilizada			13,9 ou 12,9 µL
Tampão PCR	10 × (160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670 mM Tris-HCl, pH 8.8 e estabilizador)	1 × (16 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 67 mM Tris-HCl, pH 8.8 e estabilizador)	2,5 µL
Mistura de dNTPs	10 mM de cada dNTP	0,2 mM de cada dNTP	2 µL
Taq Polimerase	5 U/µL	0,5 U	0,1 µL
Sequências iniciadoras	10 pmol/µL	0,4 pmol/µL	1 µL
BSA	0,5 µg/µL	0,02 µg/µL	0,5 µL
DMSO		2%	0,5 µL
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5 µL
Amostra (DNA)			3 ou 4µL

Condições de amplificação

Após a elaboração da mistura de reacção e da sua distribuição, juntamente com o DNA das amostras, foram utilizadas as seguintes condições térmicas de amplificação nas duas reacções da *nested*-PCR, durante 40 ciclos, no termociclador (Biometra®, T1 Thermocycler):

- | | | |
|----------------------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1) Desnaturação inicial (95°C) - 3 min | } Fragmentos gerados: | |
| 2) Desnaturação (95°C) - 1 min | | |
| 3) Ligação (55 °C) - 1 min | | ▪ 1ª Reacção: 174 bp |
| 4) Extensão inicial (72°C) - 1 min | | ▪ 2ª Reacção: 74 bp |
| 5) Extensão final (72°C) - 10 min | | |

3.2.4. Detecção dos produtos de DNA amplificados por *nested*-PCR

A revelação das amplificações do DNA foi feita por electroforese em gel de agarose com uma concentração de 1,5% (massa/volume, m/v), preparado com Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), pH 8,3. Na preparação do gel, a 1,5 g de agarose juntou-se 100 mL de TAE, que após aquecimento durante 3 min a 560 Watts (W) lhe foi adicionado 10 µL de brometo de etídeo (1%). Após polimerização da agarose, colocaram-se as amostras nos respectivos poços, tendo sido preparadas com 16 µL do produto da reacção *nested*-PCR e 1 µL de tampão de aplicação (*loading buffer*, Fermentas®) 10x concentrado. Em todas as corridas de gel, foi introduzido um marcador de peso molecular de 100 bp, (Fermentas®, GeneRuler™, 50 µg) para auxiliar a identificação dos pesos moleculares das sequências amplificadas. Durante a electroforese, aplicou-se uma diferença de potencial de cerca de 80 Volts (V) durante cerca de 50 min. Os produtos de amplificação foram visualizados no transiluminador de ultravioletas (UV) (Vilber Lourmat, ECX-20.M), a 312 nanómetros (nm), por emissão de fluorescência do brometo de etídeo intercalado nas cadeias duplas de DNA. Os resultados foram registados com o auxílio de uma câmara fotográfica.

A reacção de *nested*-PCR só foi validada, quando se visualizou uma banda com um tamanho esperado de 74 pb na amostra do controlo positivo e quando não se visualizaram bandas, no gel de agarose, nas amostras dos controlos negativos.

3.3. Caracterização genética das estirpes de *T. gondii*

Diferenciação de estirpes de *T. gondii*, nas amostras de tecidos de suínos e em produtos transformados de carne de suínos, destinados à alimentação humana, em que se detectou DNA do parasita.

3.3.1. Amostra

Todas as amostras, com resultados positivos na detecção de DNA através da amplificação do gene B1, foram submetidas à caracterização genética das estirpes de *T. gondii*.

3.3.2. *Nested-PCR* do gene SAG2 de *T. gondii*

A caracterização genética das estirpes de *T. gondii* foi feita pela amplificação do *locus* do gene SAG2, seguida de sequenciação, pela análise dos nucleotídeos das extremidades desta região. Amplificou-se separadamente as extremidades 5' e 3' do *locus* do gene SAG2 através de duas amplificações *nested-PCR* para cada região, com base no estudo de Howe, *et al.*⁴⁴, pela utilização de quatro sequências iniciadoras para as duas regiões do gene SAG2 (Quadro 9).

Quadro 9. Sequências iniciadoras utilizadas nas duas reações de *nested-PCR* para amplificação do gene SAG2 de *T. gondii*.

Sequências iniciadoras		Tamanho (pb)
F4 (5' 1ª Reacção)	5'-GCTACCTCGAACAGGAACAC-3'	20
R4 (5' 1ª Reacção)	5'-GCATCAACAGTCTTCGTTGC-3'	20
F (5' 2ª Reacção)	5'-GAAATGTTTCAGGTTGCTGC-3'	20
R2 (5' 2ª Reacção)	5'-GCAAGAGCGAACTTGAACAC-3'	20
F3 (3' 1ª Reacção)	5'-TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC-3'	21
R3 (3' 1ª Reacção)	5'-TCAAAGCGTGCAATTATCGC-3'	19
F2 (3' 2ª Reacção)	5'-ATTCTCATGCCTCCGCTTC-3'	19
R (3' 2ª Reacção)	5'-AACGTTTCACGAAGGCACAC-3'	20

Procedimento

Na elaboração da mistura de reagentes, utilizada na amplificação do gene SAG2 para o volume final de 25 µL, adicionou-se 2,5 µL da solução tampão (Bioline, 10x

NH₄), 2 µL de dNTPs (AB), 1 µL de cada sequência iniciadora (MWG Biotech AG), 0,125 µL da enzima de polimerização BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline), 0,5 µL de BSA (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ (Bioline), 4 µL da amostra, sendo o volume final preenchido com água destilada ultra pura (12,875 µL). A segunda reacção de amplificação foi efectuada com as mesmas quantidades e concentrações dos reagentes, à excepção da quantidade de amostra (8 µL) e de água (8,875 µL) (Quadro 10).

Em todas as reacções de *nested*-PCR, foram utilizados controlos positivos (cedidos pelo Laboratório Nacional de Veterinária) e controlos negativos (água ultra pura). Foram também testados controlos negativos compostos exclusivamente por tripsina e pelos reagentes utilizados no processo de extracção de DNA.

Quadro 10. Composição da mistura reaccional da *nested*-PCR para amplificação do gene SAG2 de *T. gondii*.

Componentes	Solução de trabalho	Concentração necessária	Volume para 25 µL de reacção
H ₂ O			12,875 ou 8,875 µL
Tampão PCR	10 × (160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670 mM Tris-HCl, pH 8.8 e estabilizador)	1 × (16 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 67 mM Tris-HCl, pH 8.8 e estabilizador)	2,5 µL
dNTPs mix	10 mM cada dNTP	0,2 mM cada dNTP	2 µL
Sequências iniciadoras	10 pmol/µL	0,4 pmol/µL	1 µL
DNA Taq Polimerase	5 U/µL	0,625 U	0,125 µL
BSA	0,5 µg/µL	0,02 µg/µL	1 µL
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1,5 µL
Amostra (DNA)			4 ou 8 µL

Condições de amplificação

Após a elaboração da mistura de reacção e da sua distribuição juntamente com o DNA das amostras, utilizaram-se as seguintes condições térmicas de amplificação nas

reações da *nested*-PCR, durante 40 ciclos, no termociclador (Biometra® T1 Thermocycler):

SAG2: 5' (1ª Parte):

- 1) Desnaturação inicial (94°C) - 5 min
- 2) Desnaturação (94°C) - 45 seg
- 3) Ligação (60 °C) - 45 seg
- 4) Extensão inicial (72°C) - 1 min
- 5) Extensão final (72°C) - 10 min

SAG2: 5' (2ª Parte):

- | | | |
|----------------------------------------|---|-----------------------------------|
| 1) Desnaturação inicial (94°C) - 5 min | } | Fragmento gerado:

▪ 241 bp |
| 2) Desnaturação (94°C) - 45 seg | | |
| 3) Ligação (58°C) - 45 seg | | |
| 4) Extensão inicial (72°C) - 1 min | | |
| 5) Extensão final (72°C) - 10 min | | |

SAG2: 3' (1ª Parte):

- 1) Desnaturação inicial (94°C) - 5 min
- 2) Desnaturação (94°C) - 45 seg
- 3) Ligação (58°C) - 45 seg
- 4) Extensão inicial (72°C) - 1 min
- 5) Extensão final (72°C) - 10 min

SAG2: 3' (2ª Parte):

- | | | |
|----------------------------------------|---|-----------------------------------|
| 6) Desnaturação inicial (94°C) - 5 min | } | Fragmento gerado:

▪ 221 bp |
| 7) Desnaturação (94°C) - 45 seg | | |
| 8) Ligação (55°C) - 45 seg | | |
| 9) Extensão inicial (72°C) - 1 min | | |
| 10) Extensão final (72°C) - 10 min | | |

Os produtos das reacções de *nested*-PCR foram guardados à temperatura de -20°C, na arca frigorífica, até serem detectados, por electroforese, em gel de agarose (1,5%), descrita no procedimento anterior (2.4). Quando se visualizaram fragmentos de DNA, no peso molecular pretendido, efectuou-se a sua recolha para tubos de plástico de 1,5 mL, tendo sido guardados na arca frigorífica a 4°C até serem processados para a purificação do DNA.

3.3.3. Purificação dos produtos de *nested*-PCR

Na purificação do DNA, utilizou-se o *kit* comercial “JETQUICK purification Spin Kit” da GENOMED, para a remoção de impurezas e contaminantes do DNA, anteriormente detectado por electroforese em gel de agarose.

O método é composto por quatro etapas. Inicialmente, solubiliza-se o DNA da agarose e promove-se a sua adsorção a um reagente. Após várias lavagens, por forma a eliminar possíveis contaminantes e partículas de interferência que se encontrem presentes na solução, é feita então, a eluição do DNA.

Procedimento

Foram seguidas as indicações do fabricante. A solubilização da agarose foi feita pela adição de 400 µL da solução de perclorato de sódio (NaClO₄), acetato de sódio (CH₃COONa) e tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) a 100 miligramas (mg) do produto de PCR, incubando-se a 50°C durante 30 min, com homogeneizações em intervalos de 10 min. De seguida, transferiu-se a mistura obtida anteriormente para uma coluna *Jetquick* colocada num tubo colector de 2 mL. Após centrifugação a 20200 g durante 1 min, descartou-se o filtrado.

A adsorção do DNA é obtida pela adição de 400 µL da solução de NaClO₄, CH₃COONa e TBE, aguardando-se 1 min. Após centrifugação a 20200 g durante 1 min, descartou-se o filtrado.

De seguida, foi efectuada a lavagem com 250 µL de solução de Etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCL. Após 5 min, centrifugou-se à velocidade de 20200 g durante 1 min e descartou-se o filtrado. A coluna foi colocada no mesmo colector de 2 mL e centrifugou-se à velocidade de 20200 g durante 1 min, tendo-se descartado o filtrado.

De seguida, colocou-se a coluna num tubo de 1,5 mL e adicionou-se 40 µL de água destilada ultra pura, pré-aquecida no Block Heater a uma temperatura de 60°C, directamente no centro da matriz de sílica. Após 5 min, centrifugou-se à velocidade de 20200 g durante 2 min. O DNA purificado foi guardado a uma temperatura de -20°C na arca frigorífica até ser processado.

3.3.4. Sequenciação dos produtos de *nested*-PCR

A sequenciação não foi efectuada directamente pela autora deste trabalho, tendo sido realizada pela empresa MacroGen, Inc, Coreia. A reacção de sequenciação foi feita sob condições cíclicas *Big Dye-Terminator*. Após purificação das amostras, a sequenciação foi realizada através do sequenciador automático 3730xl DNA Analyser, sendo, no final, fornecida pelos técnicos responsáveis desta entidade, já sob a forma de sequência de nucleótidos. As sequências nucleotídicas foram alinhadas e analisadas através da utilização dos programas informáticos: BLAST (versão 2.2) do NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) disponível no endereço electrónico www.ncbi.nlm.nih.gov; ClustalW (versão 1.82), *multiple sequence alignment* do EMBL-EBI, (*European Bioinformatics Institute*), acedido a partir do endereço electrónico www.ebi.ac.uk e o ChromasPro (versão 1.42, Technelysium Pty Ltd).

IV - RESULTADOS

4.1. Estudo serológico em suínos domésticos: detecção e semi-quantificação de anticorpos IgG anti-*T. gondii*

Dos 127 suínos da raça Large White, de ambos os sexos e de dois grupos etários (6 a 11 meses; ≥ 12 meses), provenientes de quatro explorações do Alto Alentejo, com práticas de produção intensiva, 10 apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii* (7,9%) (Quadro 11). Os resultados foram obtidos pela realização da técnica de MAT, a partir do *kit* comercial Toxo-Screen DA da bioMérieux® SA, que tem como limiar de detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 4 IU/mL. Verificou-se que todas as quatro (100%) explorações apresentaram animais infectados, com uma variação da prevalência de 3,6-21,4% (Quadro 11). Nove fêmeas (7,6%), das 119, e um macho (12,5%), dos oito analisados, apresentaram resultados positivos de serologia (Quadro 12). Por sua vez, em nove (7,7%) dos 117 animais, com idades compreendidas entre os 6 a 11 meses e em um (10,0%) dos dez suínos com ≥ 12 meses, foi possível detectar anticorpos IgG anti-*T. gondii* (Quadro 13).

Quadro 11. Distribuição dos resultados de serologia dos suínos da raça Large White pelas quatro explorações provenientes da região do Alto Alentejo.

Espécie	Raça	Código da exploração	Amostras analisadas	Animais com resultados positivos de serologia	
				Total	%
<i>Sus domesticus</i>	Large White	VY10B	42	4	9,5
		VW73D	16	1	6,2
		VW11P	14	3	21,4
		VW69C	55	2	3,6
	Total	4	127	10	7,9

Quadro 12. Distribuição dos resultados positivos de serologia dos suínos da raça Large White por sexo.

Espécie	Raça	Sexo	Amostras analisadas	Animais com resultados positivos de serologia	
				Total	%
<i>Sus domesticus</i>	Large White	Fêmea	119	9	7,6
		Macho	8	1	12,5

Quadro 13. Distribuição dos resultados positivos de serologia dos suínos da raça Large White por grupo etário.

Espécie	Raça	Grupo etário (meses)	Amostras analisadas	Animais com resultados positivos de serologia	
				Total	%
<i>Sus domesticus</i>	Large White	6-11	117	9	7,7
		≥12	10	1	10,0

Em relação aos 254 suínos da raça Alentejana, de ambos os sexos e de apenas um grupo etário (≥ 12 meses), provenientes de 12 explorações do Alto Alentejo, criados sob práticas de produção extensiva, 17 apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii* (6,7%) (Quadro 14). Os resultados foram obtidos pela realização da técnica de MAT, a partir do *kit* comercial Toxo-Screen DA da bioMérieux® SA, que tem como limiar de detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 4 IU/mL. Verificou-se que, das 12 explorações, utilizadas na recolha das amostras, quatro (33,3%) apresentaram animais infectados, com uma variação de infecção de 2,5-100% (Quadro 14). A prevalência da infecção nas fêmeas foi de 8,0%, por terem sido detectados sete animais nos 88 analisados, enquanto que a dos machos foi de 6,0%, ao terem sido observados dez animais com anticorpos IgG anti-*T. gondii* nos 166 estudados (Quadro 15).

Quadro 14. Distribuição dos resultados de serologia dos suínos da raça Alentejana pelas explorações provenientes da região do Alto Alentejo.

Espécie	Raça	Código da exploração	Amostras analisadas	Animais com resultados positivos de serologia	
				Total	%
<i>Sus domesticus</i>	Alentejana	VW73D	1	0	0
		VW11P	1	0	0
		VM27B	20	10	50,0
		WE72A	20	0	0
		RL17D	8	0	0
		WD40A	14	0	0
		VS02A	119	5	4,2
		VZ82A	40	1	2,5
		VD95H	1	1	100
		VJ48A	10	0	0
		VP61A	2	0	0
		VW076	8	0	0
		TC13J	10	0	0
	Total	12	254	17	6,7

Quadro 15. Distribuição dos resultados positivos de serologia dos suínos da raça Alentejana por sexo.

Espécie	Raça	Sexo	Amostras analisadas	Animais com resultados positivos de serologia	
				Total	%
<i>Sus domesticus</i>	Alentejana	Fêmea	88	7	8,0
		Macho	166	10	6,0

Desta forma, nos 381 suínos analisados, obteve-se uma seroprevalência de 7,1% por terem sido detectados anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro de 27 animais (Quadro 16). Das 14 explorações utilizadas na recolha das amostras, oito (57,1%) apresentaram suínos com resultados positivos de serologia (Quadro 16). Estes resultados representam uma prevalência global de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 7,7% nas 207 fêmeas estudadas e de 6,3% nos 174 machos analisados (Quadro 17). Por sua vez, na

distribuição da seroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nos suínos por grupo etário, verifica-se que 7,7% dos animais com idades compreendidas entre os 6 a 11 meses e 6,8% com ≥ 12 meses tinham resultados positivos (Quadro 18).

Quadro 16. Distribuição da seroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, em suínos provenientes da região do Alto Alentejo.

Espécie	Raça	Animais estudados	Animais com resultados positivos		Explorações analisadas	Explorações com resultados positivos de serologia	
			Total	%		Total	%
<i>Sus domesticus</i>	Large White	127	10	7,9	4	4	100
	Alentejana	254	17	6,7	12	4	33,3
	Total	381	27	7,1	14*	8	57,1

*Duas explorações foram utilizadas, tanto na recolha de suínos da raça Large White, como na da Alentejana.

Quadro 17. Distribuição da seroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, em suínos provenientes da região do Alto Alentejo, por sexo.

Espécie	Sexo	Animais estudados	Animais com resultados positivos	
			Total	%
<i>Sus domesticus</i>	Fêmea	207	16	7,7
	Macho	174	11	6,3

Quadro 18. Distribuição da seroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, em suínos provenientes da região do Alto Alentejo, por grupo etário.

Espécie	Grupo etário (meses)	Animais estudados	Animais com resultados positivos	
			Total	%
<i>Sus domesticus</i>	6-11	117	9	7,7
	≥ 12	264	18	6,8

Na semi-quantificação dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*, nos 10 animais da raça Large White, com resultados positivos de serologia, detectou-se uma concentração de 4 e 6 IU/mL em dois animais (20,0%); de 18 IU/mL num suíno (10,0%) e ≥ 54 IU/mL em cinco (50,0%). Por sua vez, nos animais da raça Alentejana, quatro apresentaram o título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 4 IU/mL (23,5%); cinco suínos tinham 6 IU/mL (29,4%), três 18 IU/mL (17,6%) e cinco apresentaram o título ≥ 54 IU/mL (29,4%), nos 17 suínos com resultados positivos de serologia (Quadro 19).

Assim, na totalidade dos 27 animais com resultados positivos de serologia, seis apresentaram o título de 4 IU/mL (22,2%), sete o título de 6 IU/mL (25,9%), quatro tinham 18 IU/mL (14,8%) e os restantes dez apresentaram o título ≥ 54 IU/mL (37,0%) de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (Quadro 19).

Quadro 19. Distribuição dos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nos suínos com resultados positivos de serologia.

Espécie	Raça	Título de IgG anti- <i>T. gondii</i> (IU/mL)								Total
		4		6		18		≥ 54		
		Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)	
<i>Sus domesticus</i>	Large White	2	20,0	2	20,0	1	10,0	5	50,0	10
	Alentejana	4	23,5	5	29,4	3	17,6	5	29,4	17
	Total	6	22,2	7	25,9	4	14,8	10	37,0	27

4.2. Detecção genética de *T. gondii*: amplificação do gene B1

Foi possível pesquisar DNA de *T. gondii* em 19 amostras de tecido muscular (diafragma) e em 15 amostras de tecido nervoso (encéfalo), de 19 animais dos 27 suínos com resultados positivos de serologia. Foram também analisados 42 animais com resultados negativos de serologia (42 diafragmas e 23 encéfalos), o que correspondeu a

cerca de $\geq 20\%$ dos animais (serologicamente negativos), de cada uma das oito explorações de produção animal utilizadas na recolha das amostras.

A detecção do DNA de *T. gondii*, por electroforese em gel agarose (1,5%), foi feita pela observação de fragmentos de 74 pb, após amplificação do gene B1 do parasita, por *nested*-PCR (Figura 7). Os resultados obtidos correspondem a ensaios onde houve amplificação do DNA das amostras de controlo positivo e ausência de amplificação do gene B1 nas amostras de controlo negativo (água), durante a electroforese. Quando se testaram as amostras constituídas apenas pelos reagentes utilizados, no pré-tratamento dos tecidos (tripsina) e no protocolo de extracção, não houve detecção de DNA de *T. gondii*, permitindo verificar a ausência de contaminação dos reagentes.

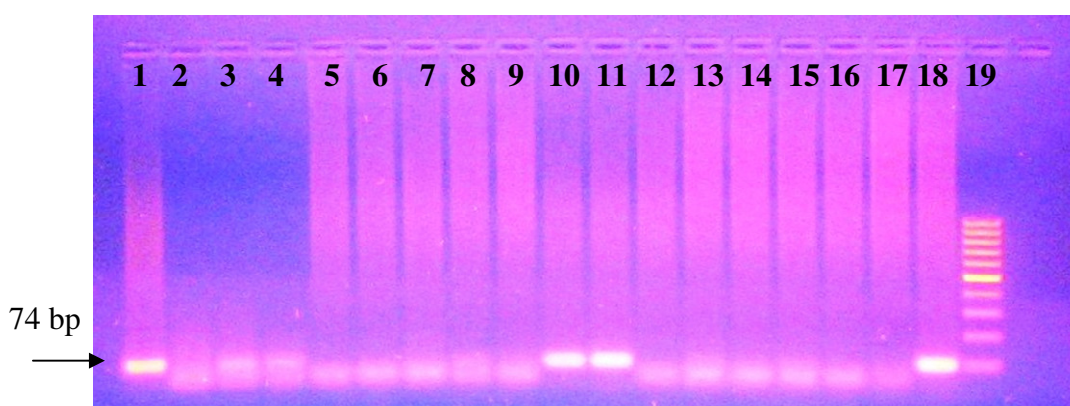


Figura 7. Resultados da detecção da amplificação do gene B1, por electroforese em gel de agarose (1,5%). 1, 10-11, 18. Amplificação do gene B1; 2-9, 12-17. Ausência de amplificação do gene B1; 17. Controlo Negativo; 18. Controlo Positivo; 19. Marcador de Peso Molecular (100 pb).

Desta forma, verificou-se a presença de DNA de *T. gondii*, por *nested*-PCR do gene B1, em sete suínos (36,8%) dos 19 animais serologicamente positivos analisados, tendo sido detectado em dois diafragmas (10,5%) dos 19 estudados e em sete encéfalos

(46,6%) dos 15 analisados. Em dois destes animais (28,6%), detectou-se DNA, tanto no tecido muscular, como no nervoso (Quadro 20). Daqueles sete suínos, dois eram da raça Large White e cinco da raça Alentejana. Os suínos eram provenientes de três (60,0%) das cinco explorações de produção animal estudadas na detecção do DNA de *T. gondii*, em que se constatarem animais serologicamente positivos (Quadro 20). Dos sete animais, cinco eram fêmeas (71,4%) e dois eram machos (28,6%) por sua vez, dois (28,6%) pertenciam ao grupo etário de 6-11 meses enquanto, que os outros cinco (71,4%) tinham idades ≥ 12 meses.

Quadro 20. Distribuição dos resultados positivos da detecção de DNA de *T. gondii*, após amplificação por *nested*-PCR do gene B1, em suínos serologicamente positivos.

Espécie	Raça	Código da expl.	Número de identificação	Sexo	Grupo etário (meses)	Resultados <i>nested</i> -PCR	
						Diafrg.	Enc.
<i>Sus domesticus</i>	L. White	VY10B	11	Fêmea	6-11	+	+
	L. White	VY10B	17	Fêmea	6-11	-	+
	Alent.	VM27B	25	Macho	≥ 12	-	+
	Alent.	VM27B	32	Fêmea	≥ 12	-	+
	Alent.	VM27B	33	Fêmea	≥ 12	-	+
	Alent.	VM27B	35	Fêmea	≥ 12	-	+
	Alent.	VZ82A	74	Macho	≥ 12	+	+

Legenda: Expl. (exploração); Diafrg. (Diafragma); Enc. (Encéfalo); L. White (Large White); Alent.

(Alentejana); + (resultado positivo); - (resultado negativo).

Constatou-se que, dos sete suínos com resultados positivos na detecção de DNA de *T. gondii* nos tecidos, serologicamente positivos, dois tinham o título de 4 IU/mL (28,6%) de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, quatro tinham 6 IU/mL (57,1%) e um ≥ 54 IU/mL (14,3%), não existindo animais com o título de 18 IU/mL (0,0%) (Quadro 21). Verificou-se que os animais, onde foi possível detectar DNA de *T. gondii* em

simultâneo nas amostras de diafragma e nas de encéfalo, tinham os títulos de anticorpos de 4 IU/mL e de 6 IU/mL (Quadro 22).

Quadro 21. Distribuição do título de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, nos suínos em que se detectou DNA de *T. gondii*, por *nested*-PCR do gene B1.

Título de IgG anti- <i>T. gondii</i> (IU/mL)								Total
4		6		18		≥ 54		
Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)	
2	28,6	4	57,1	0	0,0	1	14,3	7

Quadro 22. Comparação dos títulos de anticorpos, IgG anti-*T. gondii*, com a presença de DNA de *T. gondii* nos tecidos muscular e nervoso.

Espécie	Número de identificação do animal	Título de anticorpos (IU/mL)	Resultados <i>nested</i> -PCR	
			Diafragma	Encéfalo
<i>Sus domesticus</i>	11	6	+	+
	17	4	-	+
	25	6	-	+
	32	54	-	+
	33	6	-	+
	35	6	-	+
	74	4	+	+

Legenda: + (resultado positivo); - (resultado negativo).

Nos 42 suínos, com resultados negativos de serologia, cujas amostras foram submetidas a PCR, detectou-se DNA de *T. gondii* no tecido muscular de dois animais (4,8%), da raça Alentejana (Quadro 23). Estes dois suínos eram fêmeas com idades ≥ 12 meses e pertenciam à mesma exploração de produção animal. Não foi possível analisar o tecido nervoso destes animais, uma vez que estes suínos não foram encaminhados para a desmancha, após a linha do abate (local onde se procede à recolha do tecido nervoso). Assim, 95,2% (40), dos suínos analisados serologicamente negativos para

anticorpos IgG anti-*T. gondii*, apresentaram resultados negativos para a detecção de DNA.

Quadro 23. Distribuição dos resultados positivos da detecção de DNA de *T. gondii*, após amplificação por *nested*-PCR do gene B1, em suínos serologicamente negativos.

Espécie	Raça	Código da expl.	Número de identificação	Sexo	Grupo etário (meses)	Resultados <i>nested</i> -PCR	
						Diafrg.	Encef.
<i>Sus domesticus</i>	Alent.	VS02A	102	Fêmea	≥ 12	+	*
	Alent.	VS02A	103	Fêmea	≥ 12	+	*

Legenda: Expl. (exploração); Diafrg. (Diafragma); Encef. (Encéfalo); Alent. (Alentejana); + (resultado positivo); * (ausência de tecido).

Na pesquisa de DNA de *T. gondii* por *nested*-PCR do gene B1, nas 10 amostras de produtos transformados de carne de suínos, da região do Alto Alentejo, foi possível detectar DNA do parasita em duas amostras (20%), Ench5 (Chouriço Receita Tradicional Alentejana) e Ench7 (Farinheira de Carne) (Quadro 24).

Quadro 24. Distribuição dos resultados da detecção de DNA de *T. gondii*, nos produtos transformados de carne de suínos, após amplificação por *nested*-PCR do gene B1.

Código de amostragem	Enchido	Resultados de <i>nested</i> -PCR
Ench1	Chouriço Biológico de Porco Preto	Negativo
Ench2	Chouriço de Carne de Porco Preto	Negativo
Ench3	Painho de Porco Preto	Negativo
Ench4	Chouriço Tradicional de Porco Preto	Negativo
Ench5	Chouriço Receita Tradicional Alentejana	Positivo
Ench6	Morcela de Porco Preto	Negativo
Ench7	Farinheira de Porco Preto	Positivo
Ench8	Chouriço Receita Tradicional Alentejana	Negativo
Ench9	Chouriço de Carne de Porco Preto	Negativo
Ench10	Morcela de Porco Preto	Negativo

4.3. Caracterização genética das estirpes de *T. gondii*: amplificação do gene SAG2

Por ter sido detectado DNA de *T. gondii* em sete suínos (sete encéfalos e dois diafragmas) e em dois produtos de carne de suínos transformados, pela amplificação do gene B1, procedeu-se à tentativa de amplificação do gene SAG2 do parasita, nestes isolados, por *nested*-PCR, para a caracterização genética das estirpes encontradas. Por ser necessário a amplificação das duas extremidades 5' e 3' do *locus* do gene SAG2, realizaram-se duas amplificações por *nested*-PCR para cada região. A detecção do DNA de *T. gondii* foi feita pela visualização por electroforese em gel de agarose (1,5%), de fragmentos de 241 pb, após amplificação da extremidade 5', e de fragmentos de 221 pb, após amplificação da extremidade 3' do gene SAG2.

Os resultados obtidos correspondem a ensaios onde houve amplificação do DNA das amostras de controlo positivo e ausência de fragmentos do gene SAG2, nas amostras de controlo negativo (água), durante a electroforese. Quando se testaram as amostras, constituídas apenas pelos reagentes utilizados, no pré-tratamento dos tecidos (tripsina) e no protocolo de extracção, não houve detecção de DNA de *T. gondii*, permitindo verificar a ausência de contaminação dos reagentes.

Desta forma, foi possível detectar DNA de *T. gondii*, pela amplificação da extremidade 5' do gene SAG2, por *nested*-PCR, em cinco (38,5%) das 13 amostras positivas para o gene B1 (Quadro 25). Por sua vez, detectou-se DNA de *T. gondii*, pela amplificação da extremidade 3' do gene SAG2, por *nested*-PCR, em sete (53,8%) das 13 amostras positivas para o gene B1 (Quadro 25). Assim, apenas quatro (30,8%), das 13 amostras positivas para o gene B1, foram amplificadas por *nested*-PCR, a partir das duas extremidades 5' e 3' do gene SAG2 (Quadro 25).

Quadro 25. Distribuição dos resultados da amplificação por *nested*-PCR das extremidades 5' e 3' do gene SAG2 de *T. gondii*.

Espécie	Número de identificação	Resultados de <i>nested</i> -PCR SAG2	
		Extremidade 5'	Extremidade 3'
<i>Sus domesticus</i>	2	Negativo	Negativo
	11	Negativo	Negativo
	17	Negativo	Negativo
	25	Positivo	Negativo
	32	Positivo	Positivo
	33	Negativo	Negativo
	35	Positivo	Positivo
	58	Positivo	Positivo
	74	Negativo	Positivo
	102	Negativo	Negativo
	103	Negativo	Positivo
	112	Negativo	Positivo
	114	Positivo	Positivo

Uma vez que, a identificação das estirpes é feita pela análise das sequências nucleotídicas das extremidades 5' e 3' do gene SAG2, apenas se procedeu à purificação do DNA e posterior sequenciação das amostras, onde se detectou DNA nas duas extremidades do gene SAG2 (32, 35, 58 e 114).

Após sequenciação das amostras, constatou-se que apenas o produto da amplificação da extremidade 3' da amostra 35 apresentou complementariedade total da sua sequência genética, com o DNA de *T. gondii*, mediante análise da sequência genética no banco internacional *GenBank* no NCBI. Por sua vez, as restantes amostras, após sequenciação, não apresentaram resultados satisfatórios, que permitissem analisar as suas sequências genéticas, por terem sido obtidos gráficos de sequenciação com sinais confusos e de pouca fiabilidade. Assim, não foi possível identificar as estirpes presentes nestas amostras.

V - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A importância da toxoplasmose nos suínos está associada à transmissão da infecção ao Homem e a outros animais, assumindo-se como um problema de Saúde Pública. A realização de estudos, nesta área, e a padronização dos métodos utilizados (sensibilidade e especificidade) na identificação de animais infectados, nas explorações e na linha de produção da carne, são fundamentais para calcular o risco de adquirir toxoplasmose através do consumo de carnes infectadas e para permitir melhorar as práticas de produção animal, de maneira a reduzir ou eliminar a infecção dos animais⁴². Em Portugal, e tal como na maioria dos outros países, não é feita a monitorização da toxoplasmose nos suínos utilizados na alimentação humana. Apesar destes animais serem muito usados na gastronomia portuguesa, tanto pelo consumo de carne, como pelo de enchidos, pouco se sabe sobre a prevalência e as características genéticas das estirpes de *T. gondii* existentes nestes produtos alimentares, no país.

Com o intuito de determinar a prevalência da infecção por *T. gondii*, em suínos (*Sus domesticus*) destinados ao consumo humano, realizou-se a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pela técnica de aglutinação modificada, a partir do *kit* comercial Toxo-Screen DA da bioMérieux® SA, em suínos das raças Large White e Alentejana, adquiridos no Matadouro Regional do Alto Alentejo. A raça Large White, originária de Inglaterra, caracteriza-se pela elevada rentabilidade, nos sistemas de produção intensivos, o que resultou na sua elevada difusão pelo mundo. A raça Alentejana, oriunda do Alentejo, raça suína portuguesa com maior expressão, muito apreciada pelas características organolépticas da carne e dos enchidos, que dela se obtêm, é explorada em sistema extensivo.

Através deste estudo, detectou-se anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 7,9% dos animais da raça Large White analisados. Os suínos, serologicamente positivos, eram provenientes das quatro explorações com práticas de produção intensiva do Alto Alentejo de onde eram oriundos os animais da raça Large White, ocorrendo uma variação da distribuição da prevalência de anticorpos de 3,6-21,4%. A prevalência encontrada de anticorpos nos suínos produzidos no sistema intensivo e o facto de todas as explorações terem animais infectados, pode sugerir que não estão a ser tomadas todas as medidas de confinamento dos suínos e de isolamento dos hospedeiros intermediários e/ou definitivos da toxoplasmose, ou que estes poderão estar a ser infectados com alimentos contaminados. Por sua vez, não se verificaram diferenças significativas nas prevalências de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nos dois sexos, nos animais da raça Large White. Uma vez que se obteve uma prevalência de anticorpos de 7,6% nas fêmeas enquanto que nos machos esta foi de 12,5%. No entanto, esta pequena diferença observada poderá indicar que os machos estão mais expostos aos factores de risco da transmissão da toxoplasmose. Devem, então, ser realizados estudos para identificar esses factores. Por outro lado, a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, obtida por idade, é também semelhante entre os dois grupos etários, não se observando diferenças significativas, na medida em que, dos animais no grupo etário entre os 6 e os 11 meses 7,7% eram positivos, enquanto que no grupo etário ≥ 12 meses, 10% dos suínos tinham anticorpos anti-*T. gondii*. Contudo, a observação de uma prevalência maior de anticorpos no grupo etário ≥ 12 meses poderá ser explicada pela exposição mais prolongada destes animais a factores de risco, durante o seu desenvolvimento. Quando se pretende comparar resultados serológicos, entre vários estudos, dever-se-á ter especial atenção às técnicas serológicas utilizadas, na medida em que a sensibilidade e a especificidade dos métodos são bastante diferentes. O teste utilizado neste estudo, MAT,

foi reconhecido como um teste tão sensível e específico, para a detecção dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*, como o teste de referência, *dye test*²⁵. Tendo sido considerado como o teste mais sensível e específico para o serodiagnóstico da toxoplasmose nos suínos²⁵. Antunes, em 1984, no estudo que efectuou em 144 suínos criados em regime intensivo, da região de Lisboa, utilizando também a técnica de MAT, constatou uma prevalência de anticorpos antitoxoplásmicos de 6,9%⁶. Pela comparação dos resultados obtidos no presente trabalho (7,9%), com os observados no estudo efectuado por aquele autor, verifica-se um ligeiro aumento da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*, neste estudo, para os suínos da raça Large White, também criados em sistema intensivo, provenientes da região do Alto Alentejo. Esta ligeira diferença de resultados poderá estar associada ao facto da prevalência da toxoplasmose, variar de região para região.

Por sua vez, nos suínos da raça Alentejana, detectou-se anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 6,7% dos 254 suínos estudados. A infecção destes animais poderá ser explicada pelo facto destes serem criados ao ar livre, o que poderá permitir o contacto com os hospedeiros intermediários e/ou definitivos infectados, bem como com o solo e alimentos contaminados. Verificou-se ainda que 33,3% das 12 explorações, com práticas de produção extensiva, de onde provieram os suínos, apresentaram animais infectados, ocorrendo uma variação da distribuição da prevalência de anticorpos de 2,5-100%. Nestes animais, obteve-se uma prevalência de anticorpos de 8,0% nas fêmeas e de 6,0% nos machos, não existindo, também nesta raça, diferenças significativas de prevalência entre os dois sexos. Não foi possível analisar a distribuição dos resultados, nesta raça, por grupo etário, por terem sido apenas utilizados suínos pertencentes ao grupo etário ≥ 12 meses. Isto deveu-se ao facto dos suínos analisados da raça Alentejana estarem destinados à produção de enchidos, ocorrendo o seu abate entre os 12 a 18 meses de idade. Em 1992, Meireles, utilizando a técnica de MAT, encontrou uma

prevalência de 13,08% de anticorpos antitoxoplásmicos em 107 suínos da raça Alentejana, da região de Beja, criados em regime extensivo⁶⁰. Assim, verifica-se que os resultados de prevalência, obtidos neste estudo, para os suínos da raça Alentejana (6,7%), são inferiores aos obtidos por Meireles, em 1992⁶⁰. Estes resultados poderão ser explicados pelas alterações na produção dos animais, nomeadamente na melhoria das condições higio-sanitárias, confinamento dos animais de forma a restringir o seu contacto com hospedeiros intermediários/definitivos da toxoplasmose, estando associado à diminuição da prevalência da infecção por *T. gondii*, nesta raça de suínos.

Apesar de não significativa, observou-se maior prevalência de anticorpos, nos suínos da raça Large White (7,9%) do que nos suínos da raça Alentejana (6,7%). Uma vez que os suínos criados em sistemas extensivos, poderão estar sujeitos a um maior contacto com factores de risco de transmissão da toxoplasmose, como o contacto com os hospedeiros definitivos, sugere que estes têm uma prevalência superior à dos suínos criados em sistemas intensivos. Tal como referido anteriormente, estes resultados poderão reflectir a melhoria dos sistemas de produção, nomeadamente das condições higio-sanitárias, face ao aumento da procura da raça Alentejana, verificada nos últimos anos. O facto de apenas 33,3% das explorações com produção extensiva terem suínos infectados, enquanto que 100,0% das explorações com produção intensiva apresentavam resultados positivos, poderá indicar a melhoria desses sistemas de produção animal, relativamente à transmissão da toxoplasmose.

Assim, nos 381 suínos analisados, destinados ao consumo humano, provenientes de 14 explorações do Alto Alentejo, abatidos no Matadouro Regional do Alto Alentejo obteve-se uma prevalência global de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 7,1%, por terem sido detectados no soro de 27 animais. Constatou-se que, cerca de 57,1%, do total das explorações, de onde provieram os animais estudados, apresentaram suínos infectados.

Não se verificaram diferenças significativas na prevalência global da infecção por sexo, já que as fêmeas apresentaram uma prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 7,7% e os machos uma prevalência de anticorpos de 6,3%. Por sua vez, também não se verificaram diferenças significativas na prevalência da infecção por grupo etário, por ter sido obtida uma prevalência de infecção de 7,7% para os animais com idade compreendida entre os 6-11 meses e de 6,8% para os suínos do grupo etário de ≥ 12 meses. Em 2006, num estudo efectuado no Norte do país, com a técnica de MAT aplicada a soros de 333 suínos de Vinhais, constatou-se uma prevalência de 15,6% de anticorpos antitoxoplásmicos⁷⁰. Assim, verifica-se que a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* é menor em suínos da região do Alto Alentejo do que no Norte de Portugal. Estes resultados poderão ser explicados pelas diferenças climáticas entre as duas regiões, bem como pelo tipo de produção (semi-extensiva) dos suínos utilizados naquele estudo. É também importante referir que o limiar de detecção do MAT, utilizado no estudo de Sousa *et al.* foi de 2 IU/mL, sendo diferente do utilizado neste - 4 IU/mL.

Na semi-quantificação dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*, verificou-se que 20,0% tinham uma concentração de 4 e 6 IU/mL, 10,0% tinham 18 IU/mL e que 50,0% apresentavam ≥ 54 IU/mL, nos dez animais da raça Large White, com resultados positivos de serologia. Estes resultados revelam uma reacção imunológica intensa e uma distribuição relativamente elevada no título ≥ 54 IU/mL, por estar presente em 50% destes animais serologicamente positivos. Esta situação poderá ser explicada pelo facto dos animais, criados em sistemas de produção intensivos, estarem confinados a um espaço, não contactando com o meio exterior, o que não lhes permite adquirir imunidade. Assim, quando infectados, a resposta imunológica é elevada. Por sua vez, nos animais da raça Alentejana, 23,5% apresentaram o título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 4 IU/mL, 29,4% dos suínos tinham 6 IU/mL, 17,6% tinham 18 IU/mL e

29,4% apresentaram o título ≥ 54 IU/mL, no total dos 17 suínos com resultados positivos de serologia. Nesta raça a resposta imunológica apresentou uma distribuição mais homogênea e não tão elevada. Apenas 29,4% dos animais serologicamente positivos apresentavam um título de anticorpos ≥ 54 IU/mL. Assim, na totalidade dos 27 animais com resultados positivos de serologia, 22,2% apresentaram o título de 4 IU/mL, 25,9% o título de 6 IU/mL, 14,8% tinham 18 IU/mL e 37,0% apresentaram o título ≥ 54 IU/mL de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Verificou-se então, a existência de uma resposta imunológica intensa nos suínos infectados com *T. gondii*, estando cerca de 37,0% destes animais com uma concentração de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ≥ 54 IU/mL. Pela comparação com o estudo de Sousa, *et al.*, verifica-se que os títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, obtidos na região de Vinhais, também revelam boa resposta imunológica, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo⁷⁰.

Os resultados da prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em suínos destinados ao consumo humano, neste estudo, sugerem que apesar de se estar a observar, nas últimas décadas, uma diminuição da toxoplasmose nos suínos, nos vários países da União Europeia e nos E.U.A. para valores inferiores a 1%, face à melhoria dos sistemas de produção animal⁷⁵, a prevalência destes anticorpos obtida para os suínos da região do Alto Alentejo ainda é elevada, quando comparada com esses países. Por sua vez, nos últimos anos, tem-se vindo a assistir ao retorno das práticas de produção animal em sistemas de produção extensivos, face a uma maior exigência dos consumidores, quanto à qualidade da carne. No entanto, ainda não se conhece o efeito desta reintrodução dos sistemas extensivos, na incidência da toxoplasmose nos suínos⁵³.

Com vista a determinar o risco inerente ao consumo de carne de suíno (*Sus domesticus*) e seus derivados, na transmissão da toxoplasmose, foi também feita a

pesquisa de *T. gondii* nos tecidos muscular (diafragma) e nervoso (encéfalo) de suínos, serologicamente positivos e negativos, e em enchidos de suínos, através da detecção de DNA de *T. gondii* após amplificação por *nested*-PCR do gene B1 do parasita. Para tal, fez-se a digestão dos tecidos com tripsina por forma a concentrar os parasitas nas amostras, antes de serem submetidas à extracção de DNA. Uma vez que a localização e o número de quistos diferem com os hospedeiros e com a estirpe de *T. gondii*³², analisaram-se amostras de encéfalo e de diafragma, porque para além de serem locais onde existe uma elevada prevalência do parasita, por factores de especificidade ainda desconhecidos³², estes tecidos são vulgarmente consumidos pelo Homem. Desta forma, foi possível detectar DNA de *T. gondii*, por amplificação do gene B1, em 36,8% dos 19 animais serologicamente positivos analisados, tendo sido observado em 10,5% dos 19 diafragmas estudados e em 46,6% dos 15 encéfalos analisados. Em 28,6% destes animais, detectou-se DNA, tanto no tecido muscular, como no nervoso. Verificou-se então uma maior prevalência de *T. gondii* no tecido nervoso (46,6%) do que no muscular (10,5%). Isto poderá ser explicado por uma maior afinidade do parasita para as células do tecido nervoso do hospedeiro, ou pelo facto do tecido muscular ter uma área maior, comparativamente com o encéfalo, que pela distribuição aleatória dos quistos nos tecidos poderá diminuir a sensibilidade da técnica. Verificou-se ainda que estes animais eram provenientes de 60,0% das explorações de produção animal estudadas na detecção do DNA de *T. gondii*, para os animais serologicamente positivos. A percentagem (36,8%) de DNA de *T. gondii*, detectado nas amostras de tecido de animais infectados, é concordante com resultados obtidos, noutros estudos, realizados por outros autores. Resultados semelhantes foram observados no Brasil, em que apenas se detectou o parasita, por técnicas de biologia molecular, em 25% dos suínos seropositivos. Estas baixas percentagens podem estar associadas ao método de detecção

utilizado, não reflectindo a especificidade do teste serológico, uma vez que o MAT é considerado o teste mais sensível e específico para os suínos²². Em 2006, Hill *et al.* apenas conseguiram detectar DNA de *T. gondii* em oito (22,9%) dos 35 suínos com resultados de serologia positivos, por *real time* PCR, em cinco (14,3%) suínos por *semi-nested* PCR e em nenhum (0,0%) por PCR⁴². Estes resultados poderão ser explicados pelo tamanho da amostra, pela distribuição aleatória dos quistos e talvez pelo número reduzido de quistos nos tecidos analisados^{42,79}. Estimou-se que o número de quistos de *T. gondii*, por grama de tecido, poderá ser inferior a um quisto por 50 g^{33,79}. Desta forma, os resultados negativos devem ser vistos com precaução e não devem excluir necessariamente a presença do parasita nos tecidos analisados. São vários os factores inerentes às técnicas de PCR que influenciam o seu desempenho, como a sensibilidade, especificidade, sequência genética analisada, capacidade de detecção do parasita na presença de DNA do hospedeiro, método de extracção entre outros^{40,77}. Pelas variações dos resultados, aquando da utilização desta técnica na detecção do parasita, nos animais e nos alimentos, é necessário a padronização deste método, para ser possível uma utilização alargada com vista a aferir sobre a contaminação com *T. gondii*.

Constatou-se ainda que, dos sete suínos com resultados positivos na detecção de DNA de *T. gondii* nos tecidos, serologicamente positivos, 28,6% tinham um título de 4 IU/mL de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, 57,1% tinham 6 IU/mL e 14,3% ≥ 54 IU/mL, não existindo nenhum animal com o título de 18 IU/mL (0,0%). Verificou-se que os animais, onde foi possível detectar DNA de *T. gondii* em simultâneo nas amostras de diafragma e nas de encéfalo, tinham os títulos de anticorpos de 4 IU/mL e de 6 IU/mL. Assim, observou-se que 85,7% dos animais, onde se detectou DNA do parasita, tinham uma concentração de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ≤ 6 IU/mL, ao contrário do que seria de esperar. Isto pode dever-se a factores intrínsecos do microrganismo, tais como:

capacidade de invasão dos tecidos e baixa estimulação do sistema imunológico. Sabe-se que a virulência das infecções por *T. gondii* varia com a dose, estágio do parasita, com a estirpe, via de inoculação, idade dos suínos e com a gravidez³³. Tendo já sido verificadas diferenças na estimulação do sistema imunológico dos suínos, após infecção dos animais com diferentes estirpes de *T. gondii*⁴⁹.

Com a pesquisa de DNA de *T. gondii* em 42 animais com resultados negativos de serologia (equivalente a $\geq 20\%$ dos animais de cada exploração), pretendeu-se pesquisar a presença do parasita em animais que não apresentassem anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Assim, observaram-se resultados positivos no tecido muscular de dois animais (4,8%), da raça Alentejana. Estes suínos pertenciam à mesma exploração de produção animal. Não foi possível analisar o tecido nervoso destes animais, uma vez que estes não foram encaminhados para a desmancha, após a linha do abate. Estes resultados podem ser explicados pelo facto dos animais terem uma infecção recente, não apresentando títulos de anticorpos IgG ≥ 4 IU/mL (limiar de detecção do teste). O aparecimento de anticorpos IgG anti-*T. gondii* está dependente da estirpe do parasita, podendo ser detectados a partir do 10-17 p.i.⁴⁹.

Na pesquisa de DNA de *T. gondii* por amplificação *nested*-PCR do gene B1, nos produtos transformados de carne de suínos, da região do Alto Alentejo, foi possível detectar DNA do parasita em 20% das 10 amostras, Ench5 (Chouriço Receita Tradicional Alentejana) e Ench7 (Farinheira de Carne). Estes resultados revelam uma forte contaminação deste tipo de produtos. Uma vez que os enchidos são habitualmente ingeridos crus, ao contrário da carne, e são produzidos a partir de carnes de vários animais, estes produtos assumem um papel importante na transmissão do parasita ao Homem. A presença de DNA de *T. gondii* nestes enchidos poderá significar a existência de quistos viáveis. Contudo, devem ser realizados estudos de viabilidade destas formas

parasitárias. Tal foi evidenciado num estudo realizado no Reino Unido, relativo à contaminação por *T. gondii* dos enchidos das superfícies comerciais, onde se verificou que uma amostra de fiambre estava contaminada por quistos de *T. gondii* viáveis. Estes resultados evidenciaram que o processo de cura, habitualmente realizado na conservação destes alimentos, não foi eficaz na inactivação do parasita⁷⁷.

Após detecção de DNA de *T. gondii* em sete suínos (sete encéfalos e dois diafragmas) e em dois produtos de carne de suínos transformados, pela amplificação do gene B1, procedeu-se à tentativa de caracterizar geneticamente as estirpes encontradas, a partir da amplificação do *locus* do gene SAG2, tal como descrito por Howe *et al.* 1997⁴⁴. As amostras que não foram amplificadas pelo gene SAG2 e aquelas onde apenas foi possível amplificar uma das regiões, deste gene, foram submetidas a reamplificações e a repetições de extracção de DNA. Assim, foi possível detectar DNA de *T. gondii* em 38,5% das 13 amostras positivas para o gene B1, pela amplificação da extremidade 5' do gene SAG2, e em sete (53,8%) dessas 13 amostras, pela amplificação da extremidade 3' do gene SAG2. Quatro amostras (30,8%), das 13 positivas para o gene B1, não foram amplificadas em nenhuma das regiões, a partir do *locus* do gene SAG2 de *T. gondii*, e em quatro (30,8%), das 13 positivas para o gene B1 apenas foi possível amplificar uma das regiões, deste gene. Verificou-se, então, uma sensibilidade baixa da técnica de *nested*-PCR, para o gene SAG2, uma vez que, apenas 30,8%, das 13 amostras positivas para o gene B1, foram amplificadas por *nested*-PCR, a partir das duas extremidades 5' e 3' do gene SAG2. Este fraco resultado da amplificação poderá ser consequência do facto do gene SAG2 ser um gene de cópia única, o que poderá limitar a sua detecção em amostras com elevada quantidade de DNA do hospedeiro e baixa quantidade de DNA do organismo em estudo. Devido à discrepância de resultados entre as amplificações do gene B1 e do gene SAG2, com o intuito de verificar a

fiabilidade dos resultados das amplificações de DNA a partir do gene B1, procedeu-se à análise da sequência nucleotídica de três amostras aleatórias, amplificadas por este último método. Após sequenciação, verificou-se total homologia das sequências nucleotídicas obtidas com *T. gondii*, mediante análise da sequência genética no banco internacional *GenBank* no NCBI, confirmando os resultados obtidos na detecção de DNA por *nested*-PCR, a partir do gene B1.

Após sequenciação das amostras que foram amplificadas por *nested*-PCR, a partir das duas extremidades 5' e 3' do gene SAG2, constatou-se que apenas a extremidade 3' de uma amostra apresentou complementariedade total da sua sequência genética com o DNA de *T. gondii*, mediante análise da sequência genética no banco internacional *GenBank* no NCBI. Por sua vez, as restantes amostras, após sequenciação, não apresentaram resultados satisfatórios, que permitissem analisar as suas sequências genéticas, por terem sido obtidos gráficos de sequenciação com sinais confusos e de pouca fiabilidade, demonstrando pouca sensibilidade na reacção de amplificação do fragmento de DNA em estudo, ao ser necessário uma quantidade mínima de DNA para se conseguirem resultados satisfatórios. Assim, não foi possível identificar as estirpes presentes nestas amostras. As técnicas utilizadas, neste trabalho, para a caracterização genética das estirpes do parasita isoladas, demonstraram pouca sensibilidade. Contudo, é de salientar a importância da caracterização das estirpes de *T. gondii* para permitir não só associar o genótipo de *T. gondii* com a evolução clínica da toxoplasmose, nos humanos e nos animais, como também identificar as fontes de contaminação e promover um tratamento adequado.

VI - CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível determinar a prevalência da toxoplasmose nos suínos destinados à alimentação humana, provenientes da região do Alto Alentejo. Constatou-se que, apesar de valores inferiores de prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, comparativamente a outras regiões do país, a infecção animal na região do Alto Alentejo ainda apresenta valores preocupantes para a Saúde Pública. Nos últimos anos, tem-se vindo a assistir ao retorno das práticas de produção animal em sistemas de produção extensivos, face a uma maior exigência dos consumidores, quanto à qualidade da carne. No entanto, ainda não se conhece o efeito desta reintrodução dos sistemas extensivos, na incidência da toxoplasmose nos suínos. Apesar de neste estudo se ter verificado uma prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* ligeiramente superior nos suínos produzidos em sistemas intensivos, o risco de contaminação dos animais, criados em regime extensivo, poderá ser maior, pelo contacto com os hospedeiros definitivos e/ou intermediários contaminados. A elevada prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* observada nos suínos produzidos em sistema intensivo pode sugerir que não estão a ser tomadas todas as medidas de confinamento dos animais e de isolamento dos hospedeiros intermediários e/ou definitivos da toxoplasmose, ou que estes poderão estar a ser infectados com alimentos contaminados. Devem, então, ser identificadas e controladas as fontes de contaminação da toxoplasmose para os suínos, quer a nível regional quer em cada sistema de produção animal, de forma a evitar a sua transmissão ao Homem. Apesar de ter sido possível detectar *T. gondii* em amostras de tecido de suínos e em enchidos adquiridos em superfícies comerciais, não foi possível caracterizar as estirpes de *T. gondii* isoladas. Uma vez que o desempenho das técnicas de detecção e caracterização genética das estirpes de *T. gondii* varia consoante o laboratório, por

dependem do método de extracção, da sequência do genoma escolhida para a amplificação, das sequências iniciadoras e das condições de reacção, estes métodos devem ser padronizados para que seja possível comparar resultados obtidos em diferentes laboratórios e em diferentes regiões. Contudo, o facto de ter sido possível detectar *T. gondii* em amostras de tecido e em produtos alimentares, vulgarmente consumidos pelo Homem, pode representar um risco real de transmissão da toxoplasmose. No entanto, devem ser realizados estudos de viabilidade dos quistos detectados na carne e nos seus derivados para determinar o risco efectivo da transmissão da toxoplasmose.

Para além dos produtores, também os consumidores deverão estar devidamente informados sobre os riscos inerentes ao consumo de carne de suínos infectada e seus derivados e das medidas preventivas que devem adoptar. Nos sistemas de produção animal devem ser identificados e controlados os factores de risco de transmissão de *T. gondii* aos suínos, tais como: remoção dos gatos dos sistemas de produção animal destinados ao consumo alimentar; controlo das condições higio-sanitárias; adopção de programas de controlo de roedores; disponibilização de informação a todos os trabalhadores sobre as medidas preventivas de transmissão e monitorização de programas de vigilância e de rastreio da infecção nos animais, antes, durante e após o abate. Por sua vez, os consumidores deverão ser informados sobre os cuidados a ter durante a preparação e armazenamento de carne e derivados de suínos, nomeadamente das temperaturas a que ocorre a inactivação dos parasitas e sobre os riscos de contaminação cruzada durante a preparação dos alimentos.

Referências bibliográficas

1. AJIOKA, J.W., SOLDATI, D., 2007. *Toxoplasma, molecular and cellular biology*. Horizon Scientific Press. 625 pp.
2. ALVES, M., MATOS, O., ANTUNES, F., 2001. Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, **95**: 627-632.
3. AMBROISE-THOMAS, P., PELLOUX, H., 1993. Toxoplasmosis – congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitology Today*, **9**(2): 61-63.
4. ÂNGELO, M.H., 1983. Prevalência dos anticorpos anti-toxoplasmose. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde*, **8**: 105-111.
5. ÂNGELO, M.H., 2003. Dispositions légales et stratégies préventives de la toxoplasmose congénitale au Portugal. *Archives de pédiatre*, **10**: 25-26.
6. ANTUNES, F., 1984. Toxoplasmose, estudo da epidemiologia e da infecção congénita na região de Lisboa. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à faculdade de Medicina da Universidade Clássica de Lisboa, 1-185.
7. ANTUNES, F., ABRANCHES, P., 1978. Toxoplasmose: critérios de diagnóstico, *Revista Portuguesa de Doenças infecciosas*, **1**(4): 218-290.
8. ASPINALL, T.V., MARLEE, D., HYDE, J.E., SIMS, P.F.G., 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought?. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1193-1199.
9. BASTIEN, P., 2002. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**(1): 205-215.
10. BLACK M.W., BOOTHROYD, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**(3): 607-623.

11. BOOM, R., SOL, C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., DILLEN, P.M., NOORDAA, J.V., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 495-503.
12. BOOTHROYD, J.C., 2002. Novel solutions to the evolutionary challenge of parasitism in three parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: 429-430.
13. BOWIE, W.R., KING, A.S., WERKER, D.H., ISAAC-RENTON, J.L., BELL, A., ENG, S.B., MARION, S.A., 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking. *The Lancet*, **350**: 173-177.
14. BURG, J.L., GROVER, C.M., POULETTY, P., BOOTHROYD, J.C., 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**(8): 1787-1792.
15. CASTAGNINI, M., BERNAZZOLI, S., GINANNESCHI, C., MARCHI, B., MACCHERONI, M., TSIOLPAS, C., TANGANELLI, P., 2007. Fatal disseminated toxoplasmosis in a cardiac transplantation with seropositive match for Toxoplasma: Should prophylaxis be extended?. *Transplant Immunology*, **18**: 193-197.
16. COOK, A.J.C., GILBERT, R.E., BUFFOLANO, W., ZUFFEREY, J., PETERSEN, E., JENUM, P.A., FOULON, W., SEMPRINI, A.E., 2000. Sources of Toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal*, **321**: 142-147.
17. da SILVA, A.V., PEZERICO, S.B., de LIMA, V.L., MORETTI, L.D., PINHEIRO, J.P., TANAKA, E.M., RIBEIRO, M.G., LANGONI, H., Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Veterinary Parasitology*, **127**: 23-27.
18. DARDÉ, M.L., BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M., 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and epidemiological implications. *Journal of Parasitology*, **78** (5): 786-794.
19. DAWSON, D., 2005. Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*, **103**: 207-227.

20. DESMONTS, G., REMINGTON, J.S., 1980. Direct agglutination test for diagnosis toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, **11**(6): 562-568.
21. DIAS, R.A.F., NAVARRO, I.T., RUFFOLO, B.B., BUGNI, F.M., de CASTRO, M.V., FREIRE, R.L., 2005. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Parana State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **47**: 185-189.
22. dos SANTOS, C.B.A., CARVALHO, A.C.F.B., RAGOZO, A.M.A., SOARES, R.M., AMAKU, M., YAI, L.E.O., DUBEY, J.P., GENNARI, S.M., 2005. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **131**: 207-211.
23. DUBEY, J.P., 1996. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Veterinary Parasitology*, **64**: 65-70.
24. DUBEY, J.P., 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0,85-6% NaCl solutions at 4-20°C. *The Journal of Parasitology*, **83**: 946-949.
25. DUBEY, J.P., 1997. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Veterinary Parasitology*, **71**: 307-310.
26. DUBEY, J.P., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, **28**: 1019-1024.
27. DUBEY, J.P., 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined conditions. *Journal of Parasitology*, **84**(4): 862-865.
28. DUBEY, J.P., 2004. Toxoplasmosis – Waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, **126**: 57-72.
29. DUBEY, J.P., FRENKEL J.K., 1998. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology*, **77**: 1-32.

30. DUBEY, J.P., GAMBLE, H.R., HILL, D., SREEKUMAR, C., ROMAND, S., THULLIEZ, P., 2002. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *Journal of Parasitology*, **88**(6): 1234-1238.
31. DUBEY, J.P., KOTULA, A.W., SHARAR, A., ANDREWS, C.D., LINDSAY, D.S., 1990. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in pork. *Journal Parasitology*, **76**(2): 201-204.
32. DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology*, **11**(2): 267-299.
33. DUBEY, J.P., LUNNEY, J.K., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., ASHFORD, D.A., THULLIEZ, P., 1996. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *Journal of Parasitology*, **82**(3): 438-443.
34. DUBEY, J.P., THAYER, D. W., 1994. Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *Journal of Parasitology*, **80**(5): 764-767.
35. FRENKEL, J.K., 1988. Pathophysiology of Toxoplasmosis. *Parasitology Today*, **4**(10): 273-278.
36. FUENTES, I., RUBIO, J.M., RAMÍREZ, C., ALVAR, J., 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(4): 1566-1567.
37. FUSCO, G., RINALDI, L., GUARINO, A., PROROGA, Y.T.R., PESCE, A., GIUSEPPINA, M., CRINGOLI, G., 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Veterinary Parasitology*, **149**: 271-274.
38. GALLEGU, C., SAAVEDRA-MATIZ, C., GÓMEZ-MARÍN, J.E., 2006. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica*, **97**: 161-167.
39. GAMBLE, H.R., BRADY, R.C., DUBEY, J.P., 1999. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. *Veterinary Parasitology*, **82**: 129-136.

-
40. GARCIA, J.L., GENNARI, S.M., MACHADO, R.Z., NAVARRO, I.T., 2006. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*, **113**: 267-271.
41. GRIGG, M., BOOTHROYD, J., 2001. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 398-400.
42. HILL, D.E., CHIRUKANDOTH, S., DUBEY, J.P., LUNNEY, J.K., GAMBLE, H.R., 2006. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary Parasitology*, **144**: 9-17.
43. HILL, D.E., DUBEY, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, **8**: 634-640.
44. HOWE, D.K., HONORÉ, S., DEROUIN, F., SIBLEY, L.D., 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(6): 1411-1414.
45. HOWE, D.K., SIBLEY, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, **172**: 1561-1566.
46. JOHNSON, A.M., 1997. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. *Parasitology Today*, **13**(10): 393-397.
47. JONES, D.C., OKHRAVI, N., ADAMSON, P., TASKER, S., LIGHTMAN, S., 2000. Comparison of PCR detection methods for B1, P30 e 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous Humor. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **41**: 634-644.
48. JOYNSON, D.H.M., WREGHITT, T. G., 2001. *Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide*. Cambridge University Press: 395 pp.
49. JUNGENSEN, G., JENSEN, L., RIBER, U., HEEGAARD, P.M.H., PETERSEN, E., POULSEN, J.S.D., BILLE-HANSEN, V., LIND, P., 1999. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1307-1319.

50. KAPPERUD, G., JENUM, P.A., STRAY-PEDERSEN, B., MELBY, K.K., ESKILD, A., ENG., J., 1996. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology*, **144**: 405-412.
51. KHAN, A., FUX, B., SU, C., DUBEY, J.P., DARDÉ, M.L., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL, B.M., SIBLEY, D., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *PNAS*, **104**(37): 14872-14877.
52. KHAN, A., TAYLOR, S., SU, C., MACKEY, A.J., BOYLE, J., COLE, R., GLOVER, D., TANG, K., PAULSEN, I.T., BERRIMAN, M., BOOTHROYD, J.C., PFEFFERKOM, E.R., DUBEY, J.P., AJIOKA, J.W., ROOS, D.S., WOOTTON, J.C., SIBLEY, D., 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*, **33**(9): 2980-2992.
53. KIJLSTRA, A., EISSEN, O.A., CORNELISSEN, J., MUNNIKSMA, K., EIJCK, I., KORTBEEK, T., 2004. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **45**(9): 3165-3168.
54. KIJLSTRA, A., MEERBURG, B., CORNELISSEN, J., DE CRAEYE, S., VEREIJKEN, P., JONGERT, E., 2008. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Veterinary Parasitology*, **156**: 183-190.
55. KRAVETZ, J.D., FEDERMAN, D. G., 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *The American Journal of Medicine*, **118**: 212-216.
56. LEHMANN, T., GRAHM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., LAUNER, F., CORN, J.L., GAMBLE, H.R., DUBEY, J.P., 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infection, Genetics and Evolution*, **3**: 135-141.
57. LEITÃO, J. L. S., 1979. Prática do combate às parasitoses dos animais em Portugal. Vol. III, Fundação Calouste Gulbenkian: 163-177.
58. LEKUTIS, C., FERGUSON, D.J.P., GRIGG, M.E., CAMPS, M., BOOTHROYD, J.C., 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1285-1292.

59. LUFT, B., REMINGTON, J., 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, **15**: 211-222.
60. MEIRELES, J.A.F.S., 1992. Contribuição para o estudo da toxoplasmose animal em Portugal Continental. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, 1-336.
61. MENECEUR, P., BOULDOUYRE, M.A., AUBERT, D., VILLENA, I., MENOTTI, J., SAUVAGE, V., GARIN, J.F., DEROUIN, F., 2008. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, atovaquone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**(4): 1269-1277.
62. MIRANDA, A.M., GOMES, M.H., GUIMARÃES, M., NOGUEIRA, A., ABREU, C., FIGUEIREDO, P., 1992. Toxoplasmose cerebral em doentes com SIDA. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **15**(3): 163-171.
63. MONDRAGON, R., HOWE, D.K., DUBEY, J.P., SIBLEY, L.D., 1998. Genotypic Analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *Journal of Parasitology*, **84**(3): 639-641.
64. MONTOYA, J.G., LIESENFELD, O., 2004. Toxoplasmosis, *The Lancet*, **363**: 1965-1976.
65. MONTOYA, J.G., ROSSO, F., 2005. Diagnosis and management of Toxoplasmosis. *Clinics in Perinatology*, **32**: 705-726.
66. OLIVEIRA, J., CUNHA, S., CÔRTE-REAL, R., SAMPAIO, L., DIAS, N., SILVESTRE, A.M., 1994. Prevalência da Toxoplasmose numa população hospitalar. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **17**(4): 205-212.
67. PENA, H.F.J., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., SU, C., 2008. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal of Parasitology*, **38**: 561-569.
68. SIBLEY, L.D., BOOTHROYD, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal linkage. *Nature*, **359**: 82-85
69. SIEGEL, S. E., LUNDE, M. N., GELDERMAN, A. H., HALTERMAN, R. H., 1971. Transmission of Toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood*, **37**(4): 388-394.

70. SOUSA, S., AJZENBERG, D., CANADA, N., FREIRE, L., CORREIA DA COSTA, J.M., DARDÉ, M.L., THULLIEZ, P., DUBEY, J.P., 2006. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Veterinary Parasitology*, **135**: 133-136.
71. SU, C., EVANS, D., COLE, R.H., KISSENGER, J.C., AJIOKA, J.W., SIBLEY, L.D., 2003. Recent expansion of toxoplasma through enhanced oral transmission, *Science*, **299**: 414-416.
72. SU, C., ZHANG, X., DUBEY, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, **36**: 841-848.
73. SWITJA, K., MASTER, A., SKRZYPCZAK, M., ZABOROWSKI, P., 2005. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, **11**: 170-176.
74. TENTER, A.M., BARTA, J.R., BEVERIDGE, I., DUSZYNSKI, D.W., MEHLHORN, H., MORRISON, D.A., THOMPSON, R.C.A., CONRAD, P.A., 2002. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. *International Journal for Parasitology*, **32**: 595-616.
75. TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1217-1258.
76. WARNEKULASURIYA, M.R., JOHNSON, J.D., HOLLIMAN, R.E., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology*, **45**: 211-215.
77. WEIGEL, R.M., DUBEY, J.P., SIEGEL, A.M., KITRON, U.D., MANNELLI, A., MITCHELL, M.A., MATEUS-PINILLA, N.E., THULLIEZ, P., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., TODD, K.S., 1995. Risk Factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *Journal for Parasitology*, **81**(5): 736-741.
78. WEISS, L.M., KIM, K., 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience*. **5**: 391-405.
79. YAI, O.L.E., VIANNA, M.C.B., SOARES, R.M., CORTEZ, A., FREIRE, R.L., RICHTZENHAIN, L.J., GENNARI, S.M., 2003. Evaluation of experimental *Toxoplasma*

gondii (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **40**: 227-234.